

Affinitätsreifung von Antikörperfragmenten mittels Phagen-Display für die Entwicklung von therapeutischen IgGs

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Miriam Steinwand
aus Salzgitter

1. Referent:	Prof. Dr. Stefan Dübel
2. Referent:	Prof. Dr. Jürgen Bode
eingereicht am:	29.01.2014
mündliche Prüfung (Disputation) am:	24.06.2014

Druckjahr 2014

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Steinwand, M., Droste, P., Frenzel, A., Hust, M., Dübel, S. & Schirrmann, T. The influence of antibody fragment format on phage display based affinity maturation of IgG. mAbs 6: 1, 1-15 (2013)

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Antikörper.....	3
2.1.1 Aufbau und Funktion von Antikörpern.....	3
2.1.2 Rekombinante Antikörperfragmente.....	5
2.1.3 Therapeutische Antikörper.....	7
2.1.4 Weiterentwicklung von Antikörpern.....	9
2.2 Antikörperphagen-Display-Technologie.....	12
2.2.1 Bakteriophage M13.....	12
2.2.2 Phagen-Display.....	13
2.2.3 Antikörpergenbibliotheken.....	14
2.2.4 Selektion spezifischer Antikörperphagen.....	15
2.3 Der Tumormarker CD30.....	16
2.4 Zielsetzung.....	18
3 Material und Methoden.....	19
3.1 Material.....	19
3.1.1 Geräte und technische Anlagen.....	19
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	20
3.1.3 Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	21
3.1.4 Kits und Säulen.....	24
3.1.5 Medien und Supplemente.....	25
3.1.6 Bakterien, Bakteriophagen und Zelllinien.....	26
3.1.7 Plasmide.....	26
3.1.8 Oligonukleotide.....	27
3.1.9 Enzyme.....	29
3.1.10 Antikörper und Antigene.....	29
3.1.11 Protein- und DNA-Standards.....	30
3.1.12 Software und Datenbanken.....	30
3.2 Methoden.....	31
3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	31
3.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	35
3.2.3 Zellbiologische Methoden.....	39
3.2.4 Biochemische Methoden.....	41
3.2.5 Biophysikalische Methoden.....	44
4 Ergebnisse.....	46
4.1 Affinitätsreifung im scFv-Format zur Entwicklung von IgGs.....	46
4.1.1 Klonierung und Produktion unterschiedlicher α -MUC1-Antikörperformate.....	46
4.1.2 Bindungsstudien unterschiedlicher α -MUC1-Antikörperformate.....	47
4.1.3 Multimerbildung unterschiedlicher α -MUC1-Antikörperformate.....	48
4.2 Neue Antikörperformate für die Affinitätsreifung mittels Phagen-Display zur Entwicklung therapeutischer IgGs.....	51
4.2.1 Konvertierung von α -CD30 scFv-Phagen in scFab Δ C-, Fab- und Fab Δ C-Phagen.....	51
4.3 Affinitätsreifung unterschiedlicher α -CD30- Antikörperformate.....	54
4.3.1 Konstruktion neuer Phagemide für Antikörpergenbibliotheken.....	56
4.3.2 Herstellung mutagenisierter Antikörpergenbibliotheken.....	56
4.3.3 Selektion affinitätsgesteigerter Antikörper.....	59

4.4 Konvertierung affinitätsgesteigerter α -CD30 Antikörperfragmente in IgG- (ähnliche) Formate.....	65
4.4.1 Klonierung und Produktion der unterschiedlichen α -CD30 Antikörperformate im 10 mL-Maßstab.....	66
4.4.2 CD30-Bindungsstudien („Affinitätsranking“).....	66
4.4.3 Produktion und Reinigung im 100 mL Maßstab.....	72
4.4.4 CD30-Bindungsstudien ausgewählter α -CD30 IgGs.....	72
4.4.5 Bestimmung der Affinitäten.....	73
4.4.6 Multimerisierungstendenz affinitätsgesteigerter α -CD30 Antikörperformate.....	75
4.5 Austausch von leichter oder schwerer IgG-Kette aus affinitätsgesteigerten α -CD30 Antikörpern.....	77
4.5.1 Produktion und Reinigung von IgGs mit ausgetauschten IgG-Ketten	77
4.5.2 CD30-Bindungsstudien von IgGs mit ausgetauschten IgG-Ketten.....	78
4.6 Neukombination von Punktmutationen mittels DNA-Shuffling.....	83
4.6.1 Herstellung von neu kombinierten Antikörpergenbibliotheken.....	83
4.6.2 Selektion von Antikörpern neu kombinierten Antikörpergenbibliotheken.....	85
4.6.3 Klonierung und Produktion von neu kombinierten IgGs.....	91
4.6.4 CD30-Bindungsstudien neu kombinierter IgGs.....	91
4.6.5 Affinitätsbestimmung neu kombinierter IgGs.....	92
4.6.6 Multimerisierungstendenz neu kombinierter IgGs.....	92
4.6.7 Stabilität affinitätsgesteigerter Antikörper.....	93
5 Diskussion.....	94
5.1 Affinitätsreifung im scFv-Format für die Entwicklung von IgGs.....	96
5.2 Neue Antikörperformate für die Entwicklung von IgGs.....	99
5.3 Kombination unterschiedlicher IgG-Ketten affinitätsgesteigerter Antikörper.....	106
5.4 Affinitätsreifung von Antikörpern mittels DNA-Shuffling.....	107
5.5 Fazit.....	111
6 Ausblick.....	112
7 Abkürzungsverzeichnis.....	113
8 Abbildungsverzeichnis.....	117
9 Tabellenverzeichnis.....	119
10 Quellenverzeichnis.....	120
A Anhang.....	131

1 ZUSAMMENFASSUNG

Monoklonale Antikörper werden für die Therapie unterschiedlicher Krankheiten eingesetzt, darunter sind vor allem schwerwiegende Erkrankungen wie Krebs oder Autoimmunkrankheiten. Für diesen Zweck werden bisher vorwiegend IgGs verwendet. Die *in vitro* Affinitätsreifung findet dagegen hauptsächlich in den weniger komplexen Fragmenten der vollständiger Antikörper statt, da deren Expression durch prokaryotische Produktionswirte möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das Antikörperformat, das zur Phagen-Display basierten Affinitätsreifung eingesetzt wird, die Bindungsstärke der resultierenden IgGs beeinflusst. Die Konvertierung affinitätsgereifter Antikörper in das IgG-Format kann mit einem Affinitätsverlust einhergehen, so dass die konvertierten Antikörper keine erhöhte Affinität gegenüber dem ursprünglichen IgG haben. Diese Beobachtung wurde für den Antikörper SH313-F9 in den Formaten scFv und scFab Δ C gemacht, bei denen wahrscheinlich Mutationen bevorzugt werden, die nur durch die Präsenz des Petidlinkers zu erhöhten Affinitäten gegenüber dem Ausgangsantikörper führten. Im Gegensatz dazu behielten die im Fab Δ C-Format gereiften Antikörper ihre verstärkte Antigenbindung auch im IgG-Format bei. Durch die Deletion der jeweils C-terminalen Cysteine des Fabs wurde die Präsentation funktioneller Antikörperfragmente auf der Oberfläche von Phagen im Vergleich zum Fab-Format verbessert. Darüber hinaus wurden in dem resultierenden Fab Δ C-Fragment im Gegensatz zum Fab affinitätsgereifte Varianten selektiert.

Aufbauend auf den affinitätgesteigerten Antikörpern wurden zwei *Shuffling*-Methoden angewandt, um die Affinitäten der IgGs weiter zu erhöhen. Während das *Chain Shuffling* nicht zu einer weiteren Steigerung der Affinitäten der IgGs führte, wurde dies und teilweise auch eine gesteigerte Temperaturstabilität durch das DNA-*Shuffling* mit anschließender Phagen-Display Selektion im Fab Δ C-Format erreicht. Die dadurch erfolgreich generierten, affinitätsgereiften IgGs waren eine Bestätigung der Konvertierung affinitätsgereifter Fab Δ C in IgGs ohne den Verlust von Affinität.

Summary

Monoclonal antibodies have become an important therapeutic tool for the treatment of various diseases, mostly cancer and autoimmune diseases. For this purpose nearly all antibodies are provided as IgGs. *In vitro* affinity maturation is mostly carried out in less complex fragments of full length antibodies, because they can be expressed by prokaryotic production hosts.

In this study it was demonstrated that the antibody format used for phage display based affinity maturation influences the affinity of the corresponding IgG. The conversion of affinity matured antibody fragments into IgG can be accompanied with loss of affinity resulting in IgGs with decreased antigen binding compared to the parental clone. This behavior was shown for SH313-F9 scFv and scFab Δ C, possibly due to mutations, that led to enhanced affinities compared to the original antibody only in the presence of the peptide linker. In contrast, affinity matured Fab Δ C retained their enhanced affinity as IgG. The deletion of c-terminal cysteines led to enhanced functional expression on the phage surface and allowed the generation of affinity matured antibodies compared to Fab.

Based on the affinity matured antibodies, two shuffling methods were employed to further enhance the affinity of the IgGs. Chain shuffling of affinity matured antibody fragments converted to IgG did not lead to further enhancement of affinity. In contrast, IgGs generated by DNA shuffling had enhanced affinities and partially enhanced temperature stability compared to former affinity matured IgGs. The generation of affinity matured IgGs by DNA shuffling followed by Fab Δ C based phage display selection was a confirmation for the conversion of affinity matured Fab Δ C into IgG without losing affinity.

2 EINLEITUNG

2.1 ANTIKÖRPER

Antikörper, die auch als Immunglobuline bezeichnet werden, sind ein wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems von Vertebraten (ab der Überklasse der *Gnathostomata*). Bei einer Infektion des Organismus werden die in den B-Zellen gebildeten Antikörper in großen Mengen sezerniert und leisten einen bedeutenden Beitrag zur Bekämpfung von Pathogenen, da sie die Fähigkeit besitzen, hochaffine und spezifische Bindungen mit körperfremden Substanzen einzugehen und diese dadurch für weitere Teile des humoralen Immunsystems zu markieren. Antikörper kommen sowohl im Blutplasma als auch in extrazellulären Flüssigkeiten vor und machen ca. 20% der Proteine im Blut aus. Ihre Erforschung begann Ende des 19. Jahrhunderts, als sie von Emil von Behring und Shibasaburō Kitasato in Blutseren entdeckt wurden (Behring und Kitasato, 1980). Für diese Arbeiten wurde Emil von Behring 1901 mit dem ersten Nobelpreis für Medizin geehrt. Für die Aufklärung der molekularen Struktur von Antikörpern erhielten Gerald M. Edelman und Rodney R. Porter 1972 den Nobelpreis für Medizin. Eine weitere bahnbrechende Entdeckung war die Entwicklung der Hybridomatechnologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper (Köhler und Milstein, 1975), die 1984 mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet wurde.

2.1.1 Aufbau und Funktion von Antikörpern

Antikörper werden zur großen Immunglobulinsuperfamilie gezählt, zu der auch die T-Zellrezeptoren, und der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: *major histocompatibility complex*, MHC) zählen (Barclay, 2003). Proteine dieser Gruppe weisen mindestens eine Immunglobulin-ähnliche Faltungsdomäne auf, die aus zwei Lagen antiparalleler β -Faltblätter besteht (Huang et al., 1997).

Antikörper werden von jeweils zwei identischen leichten (engl.: *light*, L) und zwei identischen schweren Ketten (engl.: *heavy*, H) gebildet, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede schwere Kette ist zusätzlich mit einer leichten Kette über eine Disulfidbrücke verknüpft (Abbildung 2.1). Die Struktur eines Antikörpers lässt sich in variable (engl.: *variable*, V) und konstante (engl.: *constant*, C) Domänen

2 Einleitung

unterteilen, wobei die leichte Kette eine variable (V_L) und eine konstante (C_L) Domäne und die schwere Kette eine variable (V_H) und drei (IgA, IgD, IgG) bzw. vier (IgM, IgE) konstante Domänen ($C_H1-3/4$) besitzt. Die V-Domänen sind maßgeblich an der Antigenerkennung beteiligt und werden zusammen als Fv-Fragment (engl.: *fragment variable*) bezeichnet. Die Sequenzvariabilität konzentriert sich innerhalb einer variablen Domäne auf drei Regionen, die so genannten hypervariablen Regionen. Da diese Regionen die Antigenbindungsstelle (Paratop) bilden und damit die komplementäre Region ihres Antigens (Epitop) binden, werden sie auch als komplementaritätsbestimmende Regionen (engl.: *complementarity determining region*, CDR) bezeichnet. Die CDRs werden von den als Gerüstregionen (engl.: *framework*, FR) bezeichneten Bereiche eingerahmt. Diese bilden eine zylinderförmige Struktur aus β -Faltblättern, mit denen sie die CDRs stabilisieren (Wu und Kabat, 1970). Die C-Domänen spielen eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung von Effektorfunktionen. Die fünf verschiedenen Klassen (Isotypen) der Antikörper beim Menschen, die nach der jeweiligen schweren Kette α , δ , ϵ , γ und μ als IgA, IgD, IgE, IgG und IgM bezeichnet werden, unterscheiden sich in den Effektorfunktionen, Anzahl und Lokalisation im Körper. Verschiedene akzessorische Zellen, zu denen phagozytische Zellen, natürliche Killerzellen, Eosinophile und Mastzellen gehören, besitzen Rezeptoren für einen Teil der C-Domäne, der auch als Fc-Teil bezeichnet wird. So bestimmt der Fc-Teil und damit der Isotyp des Antikörpers, welche Zellen aktiviert werden.

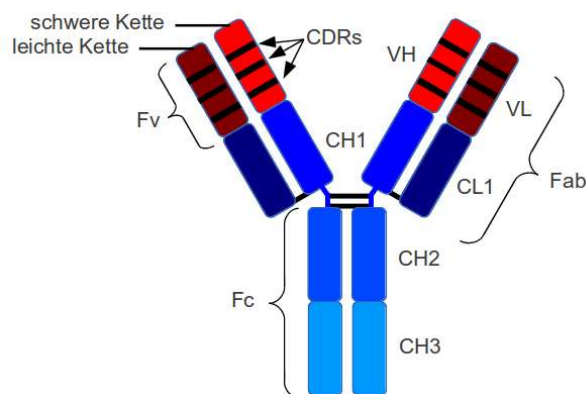


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers

CDR, *complementarity determining region*; Fab, *fragment antigen binding*; Fc, *fragment crystallisable*; Fv, *fragment variable*; C_H1-C_H3 , konstante Domäne 1-3 der schweren Kette; V_H , *variable heavy*; V_L , *variable light*

2.1.2 Rekombinante Antikörperfragmente

Für einige Anwendungsgebiete, vor allem in der Forschung und Diagnostik, ist die Verwendung von Antikörperfragmenten ausreichend, wenn nur der antigenbindende Teil eines Antikörpers benötigt wird. Für die Entwicklung von Antikörpern *in vitro*, beispielsweise zur Affinitätssteigerung oder Humanisierung wird auch mit Antikörperfragmenten gearbeitet. Aber auch innerhalb der Therapie können Effektorfunktionen unerwünscht sein, so dass Antikörperfragmente eingesetzt werden. Die Vorteile der Antikörperfragmente sind hier ihre geringere Größe verglichen mit vollständigen Antikörpern. Dadurch kann beispielsweise die Verteilung auf Tumorgewebe oder die Penetration in solide Tumore verbessert werden. Die Serumhalbwertszeit ist durch die schnellere Ausscheidung über die Nieren verkürzt (Beckman et al., 2007). Eine Übersicht über verschiedene Antikörperfragmente gibt Abbildung 2.2.

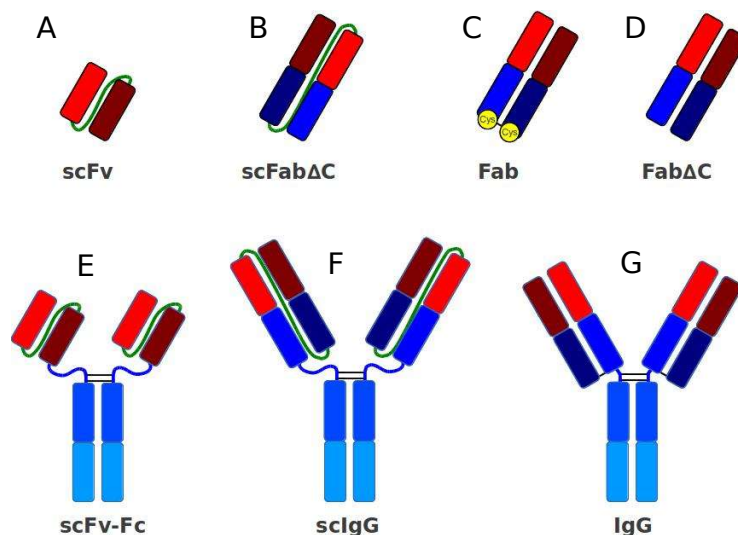


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung einiger Antikörperfragmente

Dargestellt sind die monovalenten Antikörperfragmente scFv (A), scFab Δ C (B), Fab (C) und Fab Δ C (D), sowie die bivalenten Antikörperperfusionsproteine scFv-Fc (E), scIgG (F) und IgG (G)

Das kleine Fv-Fragment enthält nur die antigenbindenden Domänen V_L und V_H . Durch das Einfügen eines meist 15-20 Aminosäuren langen, hydrophilen Peptidlinkers zwischen den beiden variablen Domänen werden diese gehindert auseinander zu diffundieren und man erhält ein scFv-Fragment (engl.: *single chain fragment variable*) (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988). Das Fab-Fragment (engl.: *fragment antigen binding*) enthält neben den beiden variablen Domänen die konstanten Domänen C_{H1} und C_L und kann durch proteolytische Spaltung mit der Cysteinprotease Papain an der

2 Einleitung

Gelenkregion eines IgGs erhalten werden (Michaelsen und Natvig, 1972). Allerdings werden die verschiedenen Antikörperfragmente heutzutage meist rekombinant hergestellt. Durch die Deletion der C-terminalen Cysteine (ΔC) beider konstanten Domänen erhält man ein Fab ΔC -Fragment. Verknüpft man hier wiederum das Fd-Fragment (*fragment difficult*, bestehend aus V_H und C_{H1}) und die leichte Kette mit einem Peptidlinker, wird ein scFab ΔC erhalten (Hust et al., 2007b). Die bisher erwähnten Antikörperfragmente lassen sich kostengünstig und in hohen Ausbeuten in bakteriellen Expressionssystemen herstellen (Frenzel et al., 2013). Meist kommt das gram-negative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) zum Einsatz, aber es gibt auch gram-positive Alternativen, welche die Sekretion von Antikörper in den Produktionsüberstand ermöglichen (Jordan et al., 2007). Bei der Verwendung von *E. coli* als Produktionswirt wird die Ausbildung der Disulfidbrücken durch die Sekretion der Antikörper in das oxidative Milieu des Periplasmas ermöglicht (Thie et al., 2008a) oder es werden spezielle *E. coli*-Stämme mit einem oxidativen Cytoplasma verwendet (Venturi et al., 2002).

Wird der Fc-Teil des Antikörpers benötigt um beispielsweise Effektorfunktionen zu vermitteln, so werden bisher oft vollständige IgGs verwendet. Eine Alternative stellt die Fusion von Antikörperfragmenten wie scFv oder scFab ΔC mit einem Fc-Teil dar, so dass die bivalenten Fusionsantikörper scFv-Fc (Moutel et al., 2009) oder sclgG (Lee et al., 1999) erhalten werden. Durch die Dimerisierung, die durch den Fc-Teil vermittelt wird, erhöht sich die apparente Affinität und die Stabilität gegenüber den kleineren Antikörperfragmenten, ihre Produktion ist bisher für Eukaryoten wie Säugetierzellen (Kato et al., 1995; Schirrmann und Büssow, 2010) und Hefen (Powers et al., 2001) beschrieben.

2.1.3 Therapeutische Antikörper

Monoklonale Antikörper stellen eine effektive Alternative für die Therapie unterschiedlicher Krankheiten dar. Eine Übersicht der von der amerikanischen Zulassungsbehörde *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassenen Antikörper-basierenden Therapien gibt Tabelle 2.1. Hieraus ist ersichtlich, dass der größte Anteil an zugelassenen Antikörpern vor allem bei Autoimmunkrankheiten und Krebs eingesetzt wird und zum IgG-Isotyp gehört. Therapeutische Antikörper können auf unterschiedliche Arten wirken: Sie können beispielsweise Substanzen wie Toxine (Pelat et al., 2007a, 2009; Chahboun et al., 2011) oder Cytokine (Alonso-Ruiz et al., 2008) neutralisieren, Rezeptoren blockieren (Peeters et al., 2009) oder an Zellen binden und damit die körpereigene Immunabwehr aktivieren (Chatenoud und Bluestone, 2007). Auch eine Kombination unterschiedlicher Wirkmechanismen ist möglich (Adams und Weiner, 2005).

Während gerade viele der früher zugelassene Antikörper murinen Ursprungs sind, ist der Großteil der später zugelassenen Antikörper, dank der Entwicklung humaner Antikörpergenbibliotheken (Clackson et al., 1991; Vaughan et al., 1996) oder transgener Tiere (Green et al., 1994; Lonberg et al., 1994; Taylor et al., 1992), human oder humanisiert. Damit weisen die Antikörper eine geringere Wahrscheinlichkeit auf, immunogen zu wirken (Zhu und Yan, 2011). Innerhalb der Krebstherapie werden Antikörper in Kombination mit Chemotherapie oder Bestrahlung eingesetzt. Oft profitieren nur Patienten mit Tumoren, die bestimmte molekulare Charakteristika aufweisen, von der Antikörper-basierten Krebstherapie und so versucht man im Vorfeld Patienten diesbezüglich auszuwählen.

Das ideale Antigen, an den ein Antikörper für die Krebstherapie bindet, sollte auf den Tumorzellen stark exprimiert werden, jedoch nicht oder nur schwach auf gesunden Gewebe. Antikörper gegen Oberflächenrezeptoren von Tumoren können beispielsweise in die Signalübertragung eingreifen und so Apoptose induzieren. Ebenso können die Antikörper aber auch mit dem Immunsystem interagieren und durch Mechanismen wie die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (engl.: *antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) oder die Komplement-abhängige Zytotoxizität (engl.: *complement dependent cytotoxicity*, CDC) den Zelltod der Tumorzelle auslösen.

Tabelle 2.1: Von der FDA zugelassene Antikörper

Name / Antikörper	Antigen	Art, Isotyp	Indikation	Firma
*OKT3: Muronomab-CD3	CD3	Murin, IgG2a	Autoimmun	Johnson & Johnson
ReoPro: Abciximab	PIIb/IIIa	Chimer, IgG1, Fab	Thrombose (präventiv)	Johnson & Johnson
Rituxan: Rituximab	CD20	Chimer, IgG1	Krebs	Genentech
*Zenapax: Daclizumab	CD25	Humanisiert, IgG1	Autoimmun	Roche
Simulect: Basiliximab	CD25	Chimer, IgG1	Autoimmun	Novartis
Synagis: Palivizumab	RSV	Humanisiert, IgG1	Infektion	MedImmune
Remicade: Infliximab	TNF α	Chimere, IgG1	Autoimmun	Johnson & Johnson
Herceptin: Trastuzumab	HER2	Humanisiert, IgG1	Krebs	Genentech / Roche
*Mylotarg: Gemtuzumab ozogamicin	CD33	Humanisiert, IgG4, Immunotoxin	Krebs	Wyeth / Pfizer
Campath: Alemtuzumab	CD52	Humanisiert, IgG1	Krebs	Genzyme
Zevalin: Ibritumomab tiuxetan	CD20	Murin, IgG1, radioaktiv	Krebs	Biogen Idec
Humira: Adalimumab	TNF α	Human, IgG1	Autoimmun	Abbott
Xolair: Omalizumab	IgE	Humanisiert, IgG1	Autoimmun	Genentech / Roche
Bexxar: Tositumomab-I-131	CD20	Murin, IgG2a, radioaktiv	Krebs	Corixa/GSK
*Raptiva: Efalizumab	CD11a	Humanisiert, IgG1	Autoimmun	Genentech / Roche
Erbix: Cetuximab	EGFR	Chimer, IgG1	Krebs	Imclone / Lilly
Avastin: Bevacizumab	VEGF	Humanisiert, IgG1	Krebs	Genentech / Roche
Tysabri: Natalizumab	α 4-Intergrin	Humanisiert, IgG4	Autoimmun	Biogen Idec
Actemra: Tocilizumab	Anti-IL-6R	Humanisiert, IgG1	Autoimmun	Chugai / Roche
Vectibix: Panitumumab	EGFR	Human, IgG2	Krebs	Amgen
Lucentis: Ranibizumab	VEGF	Humanisiert IgG1 Fab	Makulardegeneration	Genentech / Roche
Soliris: Eculizumab	C5	Humanisiert IgG2/4	Blutbildungsstörung	Alexion
Cimzia: Certolizumab pegol	TNF α	Humanisiert, pegyliert Fab	Autoimmun	UCB
Simponi: Golimumab	TNF α	Human, IgG1	Autoimmun	Johnson & Johnson
Ilaris: Canakinumab	IL1b	Human, IgG1	Entzündung	Novartis
Stelara: Ustekinumab	IL-12/23	Human, IgG1	Autoimmun	Johnson & Johnson
Arzerra: Ofatumumab	CD20	Human, IgG1	Krebs	Genmab
Prolia: Denosumab	RANK ligand	Human, IgG2	Knochenschwund	Amgen
Numax: Motavizumab	RSV	Humanisiert, IgG1	Antiinfektiva	MedImmune
ABThrax: Raxibacumab	<i>B. anthracis</i> PA	Human, IgG1	Antiinfektiva	GSK
Benlysta: Belimumab	BLyS	Human, IgG1	Autoimmun	Human Genome Sciences
Yervoy: Ipilimumab	CTLA-4	Human, IgG1	Krebs	BMS
Adcetris: Brentuximab Vedotin	CD30	Chimer, IgG1-Konjugat	Krebs	Seattle Genetics
Perjeta: Pertuzumab	Her2	Humanisiert, IgG1	Krebs	Genentech / Roche
Kadcyla: Ado-trastuzumab emtansine	Her2	Humanisiert, IgG1-Konjugat	Krebs	Genentech / Roche

* wieder vom Markt genommen

2.1.4 Weiterentwicklung von Antikörpern

Durch den Erfolg der Antikörpertherapien entsteht Konkurrenz hinsichtlich der Entwicklung von Antikörpern, gerade was Antikörper gegen viel versprechende, bereits validierte Zielproteine angeht (Igawa et al., 2011). So gibt es immer mehr Antikörper der zweiten oder dritten Generation, die verbesserte Eigenschaften aufweisen. Eine Möglichkeit der Weiterentwicklung von Antikörpern stellt die Fusion dieser mit Radionukleotiden, Zytokinen, Wirkstoffen oder Toxinen dar (Sharkey und Goldenberg, 2006).

Da die Effektorfunktion des Antikörpers durch den Fc-Teil bestimmt wird, werden diese optimiert, um verstärkte CDC (Coiffier et al., 2008; Taylor et al., 2011) oder ADCC (Shields et al., 2001) zu vermitteln. Darüber hinaus kann durch die Auswahl und Optimierung des Fc-Teils die Sicherheit des Antikörpers verbessert werden (Cardarelli et al., 2009).

Vor allem bei subkutanen Anwendungen mit langen Dosierungsintervallen, die hohe Antikörperkonzentrationen erfordern, können Eigenschaften wie geringe Stabilität oder Löslichkeit kritisch sein (Igawa et al., 2011). Auch das Auftreten von Inhomogenitäten während der Lagerung, beispielsweise durch Deamidierung kann eine Lyophilisierung nötig machen, was wiederum die Kosten und den Aufwand (auch beim Anwender) erhöht (Cacia et al., 1996; Wei et al., 2007; Igawa et al., 2011). Diese Eigenschaften können schon beim Antikörperdesign optimiert werden und erleichtern den Aufwand für die Formulierung des Antikörpers.

Die Affinität, mit der ein Antikörper an sein Antigen bindet, ist eine wichtige Eigenschaft des Antikörpers, da davon der Erfolg der Therapie abhängen kann. Meist ist eine hohe Affinität erwünscht, zumal dadurch die Dosierung und die damit verbundenen Kosten reduziert werden können (Johnson et al., 1999; Maynard et al., 2002; Wu et al., 2007; Putnam et al., 2008). Allerdings wurde bei soliden Tumoren eine schlechtere Penetration in den Tumor durch hoch affine Antikörper gegenüber niedrig affinen Antikörpern beobachtet (Adams et al., 2001). Andererseits konnte für höher affine Antikörper eine stärkere ADCC gegenüber niedrig affinen Antikörpern gezeigt werden (Tang et al., 2007).

In dieser Arbeit wurden CD30-spezifische Antikörper hinsichtlich ihrer Affinität *in vitro* optimiert. Die Affinitätsreifung von Antikörpern *in vivo* findet durch die Prozesse der

2 Einleitung

somatischen Hypermutation von Antikörpergenen und der klonalen Selektion von B-Lymphozyten statt (Defrance et al., 2002; Kocks und Rajewsky, 1988) und kann *in vitro* nachempfunden werden, indem Antikörpergene mutiert und affinere Antikörper selektiert werden (Daugherty et al., 1998; Martineau, 2002; Siegel, 2009; Thie et al., 2009; Zhao et al., 2009).

Das Einfügen von Mutationen in die Antikörpergene kann zufällig (Irving et al., 1996; Low et al., 1996; Martineau, 2002; Thie et al., 2009) oder gerichtet (Lewis und Lloyd, 2012) erfolgen. Durch die *Error-Prone*-PCR werden zufällige Mutationen in Antikörpergene, entweder durch modifizierte PCR-Bedingungen (Martineau, 2002) oder durch die Verwendung spezieller DNA-Polymerasen (Thie et al., 2009) mit erhöhter Fehlerrate eingefügt. Auch die Verwendung spezieller *E. coli*-Stämme erlaubt eine Zufallsmutagenese von Antikörpergenen (Irving et al., 1996; Low et al., 1996).

Für die Mutationen beschränkter Bereiche innerhalb der variablen Regionen, wie etwas den CDRs, eignet sich die Sättigungs-Mutagenese, bei der nahezu alle möglichen Mutationen eingefügt werden (Yang et al., 1995). Mit gerichteten Mutagenesen, wie etwa der ortsspezifischen Mutagenese (Lewis und Lloyd, 2012) oder andere Mutagenesearten wie dem Alaninscanning (Kawa et al., 2011) oder der *Look-through*-Mutagenese (Rajpal et al., 2005) lassen sich begrenzte Anzahlen von Mutanten in speziellen Bereichen der Antikörpergene generieren. Durch Computer-gestützte Designs lassen sich Mutationen vorhersagen, die zu einer Affinitätssteigerung führen (Lippow et al., 2007). Außerdem existieren viele *Shuffling*-Methoden, wie etwa DNA-*Shuffling* (Stemmer, 1994a; Jermutus et al., 2001; Liu et al., 2012; Rani et al., 2012), *Chain Shuffling* (Schier et al., 1996; Marks, 2004; Yoshinaga et al., 2008) oder CDR-*Shuffling* (Marks et al., 1992; Kobayashi et al., 2010) um neu kombinierte Antikörpervarianten zu erhalten.

Antikörper mit gesteigerten Affinitäten gegenüber dem Parentalantikörper können aus den mutierten Antikörpergenbibliotheken mit einer geeigneten Methode selektiert werden. Dafür bieten sich Phagen- (Vaughan et al., 1996; Dübel et al., 2010; Hust et al., 2011; Colwill et al., 2011), Ribosomen- (Hanes et al., 1998; Zhao et al., 2009), Hefe- (Wang et al., 2007; Siegel, 2009), mRNA- (Fukuda et al., 2006) oder *E. coli*-Display (Daugherty et al., 1998) an. Dabei können die Bedingungen, wie pH-Wert, Ionenkonzentration oder Temperatur während der Selektion eingestellt werden, um Antikörperfragmente zu selektieren, die unter den gewählten Bedingungen stabil sind. Eine lang andauernde Inkubation von Antikörperphagen mit dem Antigen ermöglichen

die Anreicherung von affinitäts- oder stabilitätsgesteigerten Antikörpern (Thie et al., 2011). Auch die Zugabe von Kompetitoren wie Antikörpern oder Antigen in diesem Schritt ermöglicht die Selektion von affinitätsgesteigerten Antikörpern.

2.2 ANTIKÖRPERPHAGEN-DISPLAY-TECHNOLOGIE

Das Antikörperphagen-Display (McCafferty et al., 1990; Hoogenboom et al., 1991; Breitling et al., 1991; Clackson et al., 1991) stellt ein effektives *in vitro* Selektionssystem zur Isolierung von rekombinanten Antikörpern aus Antikörpergenbibliotheken dar (Schofield et al., 2007; Dübel et al., 2010; Hust et al., 2011). Dabei wird die Fusion aus einem Antikörperfragment mit einem Phagenhüllprotein auf der Oberfläche eines filamentösen Bakteriophagen (kurz Phagen) präsentiert. Bei der Selektion spezifischer Antikörperphagen wird die klonale Selektion der B-Lymphozyten imitiert.

2.2.1 Bakteriophage M13

Der Bakteriophage M13 (Abbildung 2.3) gehört mit anderen filamentösen Phagen wie f1 und fd, zur Familie der *Inoviridae* (Klasse Ff) und besitzt, wie bei filamentösen Phagen üblich, ein einzelsträngiges (engl.: *single strand*, ss), zirkuläres DNA-Genom (Ray et al., 1966), das sich in einem ca. 930 nm langen und einem ungefähr 6,5 nm breiten Proteinzylinder befindet (Marvin, 1998). Zur Infektion benötigen diese Phagen den F-Pilus ihres Wirtes *E. coli* (Smith, 1985). Die ssDNA wird über eine doppelsträngige Zwischenstufe mit Hilfe von Bakterien- und Virusproteinen repliziert. Der resultierende Komplex aus ss-Virus-DNA mit vom Phagen kodierten ssDNA-bindenden Protein wird in neue Phagenhüllen verpackt. Nach einer anfänglichen Freisetzung von ca. 1000 Phagenpartikeln werden ungefähr 100-200 Phagen pro Generation freigesetzt ohne dass es zur Lyse des Wirtes, sondern nur zu einem um etwa 50% verlangsamten Wachstum kommt (Barbas III et al., 2004).

Das Phagengenom ist 6,4 kb groß (van Wezenbeek et al., 1980) und kodiert für elf Gene, darunter das ssDNA-bindende Protein, zwei dieser Gene werden für die Replikation, fünf für die Phagenhülle und drei für den Zusammenbau benötigt (Rapoza und Webster, 1995). Hauptbestandteil der Phagenhülle ist mit ca. 2700 Kopien pro Partikel das Protein pVIII (Overman und Thomas, 1995). Das Phagenprotein pIII ist für die Infektion und die Bindung an den F-Pilus essentiell (Henry und Pratt, 1969).

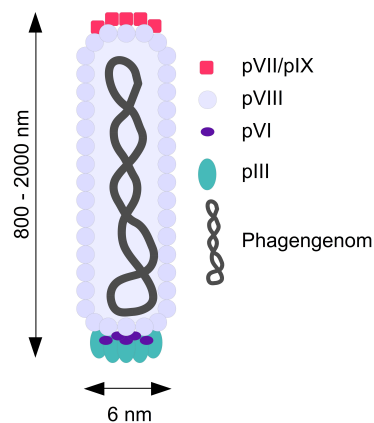


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des M13-Bakteriophagen
pIII, pVI, pVIII, pVII, pIX, Phagenproteine

2.2.2 Phagen-Display

Das Phagen-Display ermöglicht die Präsentation von Peptiden oder Proteinen auf der Oberfläche eines Bakteriophagen (Parmley und Smith, 1988). In der vorliegenden Arbeit wird dafür eine Fusion aus Antikörperfragment und pIII benutzt, es sind aber auch Fusionen mit anderen Phagenhüllproteinen möglich. Die Kopplung von Geno- und Phänotyp wird dabei durch die Integration des Fusionsproteingens in das Phagenom (Smith, 1985) oder auf einem Phagen-Display-Vektor (Barbas et al., 1991) ermöglicht (Abbildung 2.4). Das in dieser Arbeit verwendete Fusionsprotein enthält ein Signalpeptid für die Sekretion ins Periplasma von *E. coli*. Das dort herrschende oxidierende Milieu ermöglicht die Bildung der intermolekularen Disulfidbrücken und damit die korrekte Faltung des Antikörperfragments (Thie et al., 2008b). Die Expression des Antikörper-pIII-Gens kann durch einen induzierbaren Promotor wie P_{lacZ} gesteuert werden. Auf Phagen-Display-Vektoren oder Phagemiden sind außerdem noch genetische Elemente der Replikation und Selektion in *E. coli* enthalten, sowie ein Element, das der Verpackung des Phagemids in die Phagenhülle dient (Hust und Dübel, 2005). Alle weiteren Proteine, die zur Verpackung der Phagemide in Phagenhüllen benötigt werden, werden vom Genom eines Helferphagen codiert. Das Antikörper-pIII-Fusionsprotein konkurriert mit dem Wildtyp-pIII um den Einbau in die Phagenhülle, so dass statistisch ein Antikörperfragment pro Phagenpartikel präsentiert wird. Durch die Verwendung des modifizierten Helferphagen Hyperphage, dessen Genom kein Wildtyp-pIII enthält, wird ein polyvalentes Display ermöglicht (Rondot et al., 2001).

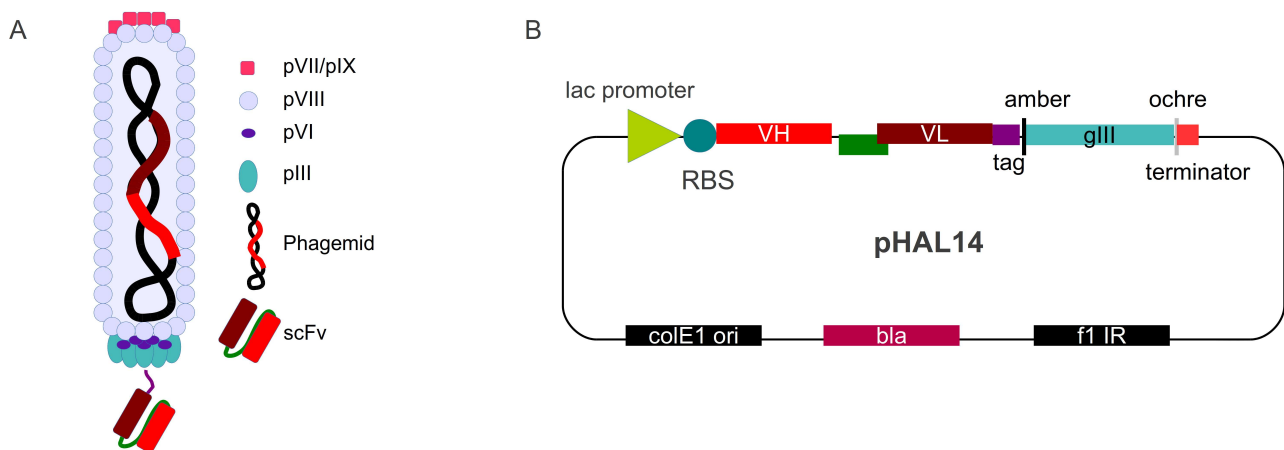


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung eines M13-scFv-Phagens und des Phagemids pHAL14

(A) M13-Phage, der über das Phagenprotein pIII mit einem scFv Antikörperfragment fusioniert ist. pIII, pVI, pVIII, pVII, pIX, Phagenproteine (B) Phagemid pHAL14. lac promoter, induzierbarer lacZ-Promotor; RBS, Ribosomen-Bindungsstelle; pelB, Gen des Signalpeptids; VH, Gen der variablen Domäne der schweren Kette; VL, Gen der variablen Domäne der leichten Kette; His- und Myc-Tag für Reinigung und Detektion des scFv-Fragments; amber, Stopp-Codon UAG; ochre, Stopp-Codon UAA; gIII, Gen des Phagen-Hüllproteins pIII; colE1, Replikationsursprung für *E. coli*; f1 IR, Phagen-Verpackungssignal; bla, β -Lactamase-Gen (Selektionsmarker).

2.2.3 Antikörpergenbibliotheken

Für den Erfolg von *in vitro* Selektionssystemen für Antikörper wie dem AntikörperPhagen-Display sind die verwendeten Antikörpergenbibliotheken ausschlaggebend. Es existiert eine Vielzahl von Antikörpergenbibliotheken, die sich bezüglich der Zusammensetzung von FR- und CDR-Bereichen, sowie in der Komplexität und dem Anteil vollständiger Antikörpersequenzen unterscheiden. Grundsätzlich gibt es universelle Bibliotheken und Immunbibliotheken, wobei sich erstere in naive, semi-synthetische und synthetische Bibliotheken einteilen lassen. Durch die Isolation des IgM-Repertoires nicht immunisierter Spender lassen sich naive Bibliotheken mit Antikörperdiversitäten von 10^8 - 10^{10} generieren (Vaughan et al., 1996; de Haard et al., 1999; Hust et al., 2011), wodurch Antikörper gegen nahezu jedes Antigen isoliert werden können (Marks et al., 1991; Griffiths et al., 1993). Bei semi-synthetischen Bibliotheken werden im Gegensatz zu naiven Bibliotheken einzelne Aminosäuren (AS) in den CDR-Bereichen individueller Antikörper randomisiert (Hoet et al., 2005). Synthetische Bibliotheken nutzen definierte FR-Bereiche mit randomisierten CDR-Bereichen, wodurch sich eine Komplexität über 10^{11} erreichen lässt (Knappik et al.,

2000; Rothe et al., 2008; Prassler et al., 2011; Tiller et al., 2013).

Bei Immunbibliotheken werden immunisierte Spenderorganismen, in denen primäre und sekundäre Immunantworten gegen das gewünschte Antigen bereits erfolgt sind, genutzt. Es lassen sich also V_H und V_L aus affinitätsgereiften IgGs gegen das gewählte Antigen isolieren (Huse et al., 1992; Chahboun et al., 2011).

2.2.4 Selektion spezifischer Antikörperphagen

Das Antikörperphagen-Display ermöglicht die Selektion von spezifischen Antikörpern aus komplexen Antikörpergenbibliotheken. Diese Selektion wird nach der Arbeit der Goldwäscher als Panning bezeichnet (Parmley und Smith, 1988).

Das Zielantigen, gegen das Antikörper isoliert werden sollen, wird entweder auf einer festen Phase, wie etwa Mikrotiterplatten (Barbas et al., 1991), Immunoröhrchen (Hust et al., 2002) oder an magnetische Beads (Hawkins et al., 1992) immobilisiert, oder es befindet sich frei in Lösung (Schütte et al., 2009). Die Bindung von Antikörperphagen an Oberflächen wird durch das Abblocken freier Bindungsstellen z.B. mit Milchpulver oder BSA verhindert, zudem ermöglicht eine Präadsorption der Antikörperphagen-Bibliothek in mit Milchpulver/BSA bedeckten Oberflächen das Abtrennen unspezifischer Binder. Dann erfolgt die Inkubation der Antikörperphagen-Bibliothek auf dem Zielantigen unter definierten Bedingungen, beispielsweise in Anwesenheit eines Kompetitors, unter bestimmten pH-Werten oder Ionenkonzentrationen (Hust et al., 2007a). Anschließend werden nicht oder schwach bindende Antikörperphagen weg gewaschen. Die Elution von spezifischen Antikörperphagen erfolgt z.B. enzymatisch durch Trypsin oder durch Absenkung des pH-Wertes (Barbas et al., 1991). Die eluierten Phagen werden zur Infektion von *E. coli* genutzt, anschließend erfolgt durch Koinfektion eines Helferphagens die Verpackung der Phagemide in Antikörperphagen, die für eine weitere Selektionsrunde eingesetzt werden können. Normalerweise sind zwei bis drei solcher Panningrunden erforderlich, um spezifische Antikörperfragmente zu identifizieren, was wiederum durch die Produktion monoklonaler Antikörperfragmente in *E. coli* und die Detektion dieser mittels ELISA erfolgt (Hust et al., 2007a).

2.3 DER TUMORMARKER CD30

Der Zytokinrezeptor CD30 eignet sich durch seine Überexpression im pathologischen Kontext einerseits und seiner geringen Expression auf gesundem Gewebe andererseits, als Zielantigen für eine Antikörper-basierte Therapie. So ist CD30 auf Hodgkin-Lymphomen (HL) und einigen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) wie dem großzellig-anaplastischen Lymphom (engl.: *anaplastic large cell lymphom*, ALCL) stark exprimiert (Falini et al., 1995; Gerber, 2010). Eine normale CD30-Expression findet man auf aktivierten, proliferierenden bzw. virusinfizierten Lymphozyten und außerdem im parafolikulären Raum der Lymphknoten und in endometrialen, deciduellen Zellen (Horie und Watanabe, 1998; Watanabe et al., 2008).

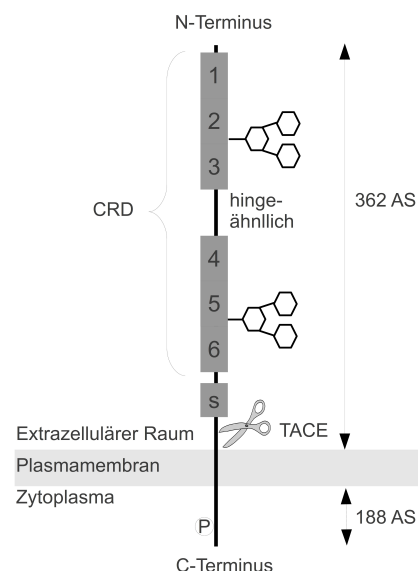


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des CD30

AS, Aminosäure; CRD, *cysteine rich repeat domain*; P, Phosphat; TACE, *Tumor necrosis factor- α converting enzyme*; modifiziert nach Schirrmann et al., 2013

CD30 ist ein 120 kDa großes, stark glykosyliertes Typ I Transmembranprotein und gehört zur Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie (TNFRSF) (Falini et al., 1995). Der N-terminale, extrazelluläre Teil, der Homologien zu anderen Mitgliedern der TNFRSF aufweist, besitzt sechs Cystein reiche Motive, die im mittleren Teil durch eine 50 AS lange, stark O-glykosylierte Region unterbrochen sind (Falini et al., 1995) (Abbildung 2.5). Durch enzymatische Spaltung von CD30 durch Zink-Metalloproteasen wird der extrazelluläre Teil abgespalten und so die lösliche Variante des CD30 (engl.: *soluble* CD30, sCD30) freigesetzt (Falini et al., 1995). Erhöhte sCD30-Konzentrationen

im Serum weisen auf eine schlechte Prognose bei HL oder ALCL hin, allerdings sind auch bei Autoimmunkrankheiten (Systemische Lupus Erythematos, rheumatische Arthritis) oder virale Infektionen (HIV, Hepatitis B Virus, EBV) die sCD30-Level erhöht (Zanotti et al., 2002; Visco et al., 2006). Der C-terminale, intrazelluläre Teil des CD30 enthält im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TNFRSF keine Todesdomäne, bindet aber an die TNFR-assoziierten Faktoren (TRAF)-1, -2, -3 und -5, die wiederum andere Proteine (p38-Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK), c-Jun N-terminale Kinase (JNK)) und den NF- κ B Signalweg aktivieren (Schirrmann et al., 2013).

Der natürliche Ligand CD30L (auch CD153) gehört der Familie des Tumor Nekrose Faktors (TNF) an (Smith et al., 1993). Durch die Bindung von CD30L an CD30 kommt es, wie bei anderen Mitgliedern der TNFRSF zur Trimerisierung des CD30, was in Abhängigkeit des zellulären Kontexts zu ganz unterschiedlichen Effekten, wie Aktivierung, Differenzierung, Zellproliferation oder aber zum Zelltod führt (Falini et al., 1995; Horie und Watanabe, 1998). CD30L ist ein membranverankertes Protein, das auf aktivierten T-, B- und NK-Zellen, Eosinophilen, Neutrophilen, Monozyten und Mastzellen vorkommt (Smith et al., 1993; Gerber, 2010).

Zahlreiche anti-CD30-Antikörper-basierte Therapien wurden bereits in klinischen Studien überprüft, darunter monoklonale Antikörper, bispezifische Antikörper und Antikörperkonjugate mit Immuntoxinen oder radioaktiven Substanzen. Beim Großteil der untersuchten Therapeutika blieb ein Langzeiterfolg aus und besonders die Immunkonjugate lösten starke Nebenwirkungen aus (Böll et al., 2009). Eine Weiterentwicklung sind rein humane Immunkonjugate aus scFv-Fc-RNase-Fusionen, die das Wachstum von CD30⁺-Lymphomzellen hemmen und von denen geringere Immunogenitäten erwartet werden (Menzel et al., 2008; Wezler et al., 2012). Das Wirkstoffimmunkonjugat Brentuximab vedotin (Adcetris®) ist das bisher einzige zugelassene anti-CD30-Antikörper-basierte Therapeutikum. Aufgrund der Ergebnisse zweier Studien, in denen eine objektive Ansprechrates von 73% (HL) bzw. 86% (sALCL, systemische ALCL) und eine komplette Remission von 32% (HL) bzw. 57% (sALCL) erreicht wurde, erfolgte 2011 die vorzeitige Zulassung von Brentuximab vedotin durch die FDA (de Claro et al., 2012).

2.4 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Strategie für die Affinitätsreifung therapeutischer IgGs mittels Phagen-Display. Dazu soll zunächst die bereits erfolgte Affinitätsreifung im scFv-Format des MUC1-spezifischen IIB6 für IgGs überprüft werden. Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollen verschiedene Antikörperformate der CD30-spezifischen Antikörperklone SH313-B5 und -F9 für den Einsatz im Phagen-Display hinsichtlich der Antigenbindung und der Präsentation auf Phagen evaluiert werden. Es sollen mutagenisierte Antikörpergenbibliotheken in geeigneten Antikörperformaten erstellt werden, aus denen anschließend durch spezielle Panningstrategien Antikörperfragmente mit erhöhten Affinitäten gegenüber dem Ausgangsantikörper selektiert werden. Affinitätsgereifte Antikörperklone aus den verschiedenen Formaten sollen in vollständige IgGs und IgG-ähnliche Moleküle überführt und ihre Eigenschaften bezüglich Antigenbindung und Konformation verglichen werden. Daraus sollen Aussagen über den Einfluss der verwendeten Antikörperformate auf die Affinitätsreifung von IgGs mittels Phagen-Display getroffen werden. Aufbauend darauf sollen selektierte Mutationen miteinander kombiniert werden und ebenfalls im IgG-Format verglichen werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 Geräte und technische Anlagen

Die bei der Durchführung dieser Arbeit verwendeten Geräte und technische Anlagen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Geräte und technische Anlagen

Geräte	Model	Hersteller
Blot-Apparatur	Trans Blot SD	BioRad, München
Chromatographieanlage	Äkta-Purifier	GE Healthcare, München
Durchflussszytometer	Cytomics FC 500	Beckmann Coulter, Brea (USA)
Deepwell-Schüttler	Vortemp 56	Labnet, Woodbridge (USA)
Dewar-Gefäß	MVE XC 47/11-10	Princeton Cryogenics, Flemington (USA)
Elektrophorese-Apparaturen	Model 40-0708/40-2314	PeQLab, Erlangen
ELISA-Reader	Mini Protean III	BioRad, München
ELISA-Washer	Tecan SUNRISE	Tecan, Crailsheim
Filtrationseinheit	Columbus Plus	Tecan, Crailsheim
Geldokumentation	Nalge	Nunc, Wiesbaden
Inkubatoren	Gel Jet Imager	Intas, Göttingen
	Hera Cell (CO ₂ begast)	Kendro Lab, Products, Hanau
	HT Minitron (CO ₂ begast)	Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
	HT Multitron	Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
	Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
	Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf, Hamburg
	Typ BE400	Memmert, Schwabach
Lichtmikroskop	Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
Mischgerät	Vortex Genie 2	Scientific Industries, NewYork, USA
MTP-Schüttelinkubator	Thermo Shaker PST-60H-4	Lab4you, Berlin
MTP-Schüttler	Titramax 101	Heidolph Instruments, Schwabach
Netzgerät	EPS 301 und 601	GE Healthcare, München
pH-Meter	CG810	Schott, Mainz
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg
	Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
	e1200	BIOHIT, Helsinki (Finnland)
Pipettierhilfe	Accu-jet	Brand, Wertheim
Protein-Reinigung	Profinia Purification	BioRad, München
Reinstwasseranlage	Arium 611	Sartorius, Göttingen

3 Material und Methoden

Geräte	Model	Hersteller
Rotoren	SS34 (Sorvall)	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
	F9S-4×1000y	FIBERLite, Santa Clara (USA)
	F12S-6×500y	FIBERLite, Santa Clara (USA)
	F21-8×50	FIBERLite, Santa Clara (USA)
Saugpumpen	ISM 832	Ismatec, Glattbrugg (Schweiz)
Schüttelinkubatoren	Certomat BS-1	Braun, Melsungen
	Minitron	Infors HT, Bottmingen (Schweiz)
	Multitron	Infors HT, Bottmingen (Schweiz)
SPR-Messgerät	BIAcore2000™	GE Healthcare, München
Spektrophotometer	ND1000	PeqLab, Erlangen
	Libra S11	Biochrome, Cambridge (England)
Sterilwerkbänke	MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
	HERAsafe	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
Thermocycler	PTC-200	MJ Research, Waltham (USA)
Tiefkühlschrank	Herafreeze™	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
Überkopfschüttler	Rotator	GKisker, Steinfurt
Vakuumpumpe	Laboport	KNF Neuberger, Freiburg
Waagen	Laboratory LC 6200 D	Sartorius, Göttingen
	E 1200 S	Sartorius, Göttingen
	A 120 S	Sartorius, Göttingen
	Wasserbad GFL	Laborbedarf, Braunschweig
Zentrifugen	5414 D	Eppendorf, Hamburg
	5810 R	Eppendorf, Hamburg
	Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
	Sorvall RC5B Plus	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
	Sorvall RC6 Plus	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
	Sprout	Heathrow Scientific, Illinois (USA)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
CM5-Chip	GE-Healthcare, München
Combitips plus 1 mL	Eppendorf, Hamburg
Einmal-Spatel	VWR, Darmstadt
Elektroporationsküvetten <i>Gene Pulser</i> , 1 mm	Bio-Rad, München
Erlenmeyerkolben (Einweg)	Corning, München
Filter 0,2 µm; 0,45 µm; 0,8 µm	Sartorius, Göttingen
Filterpapier GB002	Schleicher & Schüll, Dassel
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kulturplatten 7 cm, 15 cm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Kulturplatten Zellkultur 100 x 20 mm	SPL Life Science, Gyeonggi-Do (Korea)

Kulturplatten Zellkultur 6 well	SPL Life Science, Gyeonggi-Do (Korea)
Küvetten (Einweg)	Brand, Wertheim
Mikrotiterplatten U96 PP 0,5 mL	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten U96 PS Costar 9018	Corning, München
Mikrotiterplatten U96 PS MaxiSorp	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Mikroschraubröhrchen, 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	American National Can, Chicago (USA)
PCR-Reaktionsgefäß	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht; Eppendorf, Hamburg; Gilson, Middleton
Polypropylen-Röhrchen 15 mL, 50 mL	Corning, München
Probengefäße, Glas (Biacore)	Chromacol LTD, Hertfordshire (UK)
Probengefäße, PP (Biacore)	Gilson, Middleton (USA)
PVDF-Membran, T830.1	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhre 5 mL (Durchflusszytometrie)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen Braun Injekt 1 / 2 / 5 / 10 / 20 mL	B. Braun, Melsungen

3.1.3 Chemikalien, Lösungen und Puffer

In Tabelle 3.3 sind die Chemikalien, die für die Herstellung der Lösungen verwendet wurden aufgeführt. Nicht aufgelistete Chemikalien entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad und wurden, sofern nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), BD (Sparks, USA), Carl Roth (Karlsruhe), GE Healthcare (München), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Sarstedt), Roche (Mannheim), Fluka/Sigma-Aldrich (Neu-Ulm) und Serva (Heidelberg).

Tabelle 3.3: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung		
Allgemeines			
Kaliumphosphatpuffer	0,17	M	KH ₂ PO ₄
	0,72	M	K ₂ HPO ₄
M-PBST	2	% (w/v)	Milchpulver in PBS
PBS (pH 7,4)	0,8	% (w/v)	NaCl
	0,02	% (w/v)	KCl
	0,144	% (w/v)	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	0,024	% (w/v)	KH ₂ PO ₄
PBS-T	0,05	% (v/v)	Tween 20 in PBS
Glycerin	87	% (v/v)	Glycerin

3 Material und Methoden

Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegel			0,7-2 % (w/v) Agarose in 1xTAE
Ethidiumbromidlösung			0,01 % (w/v) Ethidiumbromid
1xTAE-Puffer (pH 8,0)	40	mM	Tris HCl
	20	mM	Essigsäure
	2	mM	EDTA

Coomassie®-Färbung

Coomassie® Färbelösung	10	% (v/v)	Essigsäure and
	0,05	% (w/v)	Coomassie® Brilliant Blue R250
Entfärbelösung	10	% (v/v)	Essigsäure

Durchflussszytometrie

Propidiumiodidlösung	2	µg/mL	Propidiumiodid
Puffer	2	mM	EDTA
	2	% (v/v)	FCS in PBS

ELISA

Blockpuffer (Antigen-ELISA)	2	% (w/v)	Milchpulver in PBST
Blockpuffer (<i>human capture</i> ELISA)	30	% (v/v)	FCS in PBS
ELISA-Stopplösung	0,5	M	H ₂ SO ₄ in H ₂ O
TMB-Lösung A (pH 4,1)	30	mM	Kaliumcitrat
	0,5	M	Zitronensäure
TMB-Lösung B	10	mM	Tetramethylbenzidin
	10	% (v/v)	Aceton
	90	% (v/v)	Ethanol
	0,3	% (v/v)	H ₂ O ₂
TMB-Substratlösung	20	Teile	Lösung A
	1	Teil	Lösung B

Größenausschlusschromatographie

Lagerungspuffer	20	% (v/v)	Ethanol
-----------------	----	---------	---------

Herstellung chemo-kompetenter *E. coli*

TFB1 (pH 5,8)	10	mM	CaCl ₂
	30	mM	Kaliumacetat
	100	mM	RbCl
	50	mM	MnCl ₂
	15	% (v/v)	Glycerin
TFB2 (pH 8,0)	10	mM	MOP
	10	mM	RbCl
	50	mM	CaCl ₂
	15	% (v/v)	Glycerin

Oberflächenplasmonresonanz

EDC	0,5	M	EDC
NHS	0,1	M	NHS

PCR

dNTPs	10	mM	dNTPs
-------	----	----	-------

Phagenfällung

PEG/NaCl-Lösung	20	% (w/v)	PEG 6000
	2,5	M	NaCl
Phage Dilution Buffer (pH 7,5)	10	mM	Tris-HCL
	20	mM	NaCl
	2	mM	EDTA

Panning

Panningblock	1	% (w/v)	Milchpulver
	1	% (w/v)	BSA in PBS-T
Trypsinlösung	10	mg/L	Trypsin in PBS

Proteinreinigung

5x-Binde- und Entsalzungspuffer (pH 7,4)	685	mM	NaCL
	13,5	mM	KCL
	40,5	mM	KH ₂ PO ₄
	21,5	mM	Na ₂ HPO ₄
5x Elutionspuffer (pH 3,0)	500	mM	Natriumcitrat
	1	M	NaCL
2x Cleaning-Lösung 1 (pH 8,0)	100	mM	Tris
	2	M	NaCl
4x Cleaning-Lösung 2 (pH 4,5)	400	mM	CH ₂ COONa
2x Lagerungslösung (Entsalzungssäule)	4	% (v/v)	Benzylalkohol
1x Lagerungslösung (Protein A Säule)	20	% (v/v)	Ethanol
Regenerationslösung	0,1	M	NaOH

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamidmix	30	% (w/v)	Acrylamid
	0,8	% (w/v)	Bisacrylamid
APS-Lösung	10	% (w/v)	Ammoniumperoxiddisulfat in Wasser
Laufpuffer	25	mM	Tris-HCl
	192	mM	Glycin
	0,1	% (w/v)	SDS
5x Laemmli-Puffer	10	% (w/v)	SDS
	50	% (v/v)	Glycerin
	0,02	% (w/v)	Bromphenolblau
	15	% (v/v)	β-Mercaptoethanol
SDS-Lösung	10	% (w/v)	SDS
Sammelgel	1000	μL	H ₂ O
	260	μL	Acrylamidmix
	200	μL	Tris-HCl (pH 6,8)
	15	μL	10 % (w/v) SDS
	15	μL	10 % (w/v) APS
	2	μL	TEMED

3 Material und Methoden

Trenngel (10-12 %)	1300	μL	H ₂ O
	1600	μL	Acrylamidmix
	1000	μL	Tris HCl (pH 8,8)
	40	μL	10 % (w/v) SDS
	40	μL	10 % (w/v) APS
	2	μL	TEMED
Laufpuffer (pH 8,3)	25	mM	Tris-HCl
	192	mM	Glycin
	0,1	% (w/v)	SDS-Lösung
Western Blot und Immunostain			
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	15	g/L	In 70 % (v/v) DMF
Laufpuffer (pH 8,3)	25	mM	Tris-HCl
	192	mM	Glycin
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	30	g/L	In 70 % (v/v) DMF
AP-Substratpuffer	100	mM	Tris-HCl
	0,5	mM	MgCl ₂
AP-Substratlösung	1:100		BCIP
	1:100		NBT in Substratpuffer
LumiGlo Reagent A & B			Cell Singaling Technology, USA 0912011
Zellkultur			
DMSO			
Polyethylenimin	1	mg/mL	Polyethylenimin
Trypanblau	0,4	% (w/v)	Trypanblau in PBS

3.1.4 Kits und Säulen

Tabelle 3.4: Verwendete Kits und Säulen

Bezeichnung	Hersteller
Amine Coupling Kit (Biacore)	GE-Healthcare, München
Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 Desalting Cartridge TM	Bio-Rad, München
Bio-Scale Mini UNOsphere Supra Cartridge TM	Bio-Rad, München
GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Heilbronn
Human Antibody Capture Kit	GE-Healthcare, München
MabSelect SuRe	GE-Healthcare, München
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid TM	Macherey-Nagel, Düren
Superdex200 16/600	GE-Healthcare, München
Superdex200 10/300	GE-Healthcare, München
ZR Plasmid Miniprep - classic	Zymo Research, Irvine (USA)

3.1.5 Medien und Supplemente

Tabelle 3.5: Verwendete Medien und Supplemente

Bezeichnung	Zusammensetzung		
2x TY-Agar	1,5	% (w/v)	Bacto Agar in 2xTY
2x TY-Medium (pH 7)	1,6	% (w/v)	Bacto Trypton
	1	% (w/v)	Hefeextrakt
	0,5	% (w/v)	NaCl
Ampicillin	100	mg/mL	Ampicilin
Glukoselösung	2	M	Glukose
F17-Medium			FreeStyle F17 Expressionsmedium (Invitrogen, Darmstadt)
	25	µg/mL	G418
	7,5	mM	L-Glutamin (PAA, Pasching, AUS)
	0,1	% (v/v)	Pluronic F-68 (Applichem, Darmstadt)
bei Zufütterung:	0,1	% (w/v)	Trypton N1 (PAA, Pasching, AUS)
IPTG-Lösung	10	mg/mL	IPTG
LB-Medium (pH 7)	1	% (w/v)	Bacto Trypton
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	1	% (w/v)	NaCl
2x YT-A	100	µg/mL	Ampicillin in 2x YT
2x YT-GA	100	mM	Glukose
	100	µg/mL	Ampicillin in 2x YT
Penicillin/Streptomycin	10.000	U/mL	Penicillin
	10	mg/mL	Streptomycin
Phosphatgeguftertes 2 x TY-Medium (2 x TY-P)	10	% (v/v)	Kaliumphosphatpuffer in 2x TY
RPMI 1640 Medium			RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH)
	4-20	% (v/v)	Fötales Kälber Serum (FCS)
	1	% (v/v)	Penicillin/Streptomycin
Saccharose	2,5	M	Saccharose
SOC-Medium	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	2,0	% (w/v)	Bacto-Trypton
	0,05	% (w/v)	NaCl
	10	mM	MgCl ₂
	20	mM	Glukose
Trypton	0,1	% (w/v)	Trypton N1 (PAA, Pasching, AUS)
Valproinsäure	4	mM	Valproinsäure

3.1.6 Bakterien, Bakteriophagen und Zelllinien

Tabelle 3.6: Verwendete Bakterien, Bakteriophagen und Zelllinien

Name	Beschreibung/Genotyp	Referenz/Herkunft
<i>E. coli</i> XL1- Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac$ [F' proAB, <i>lacIqZ</i> Δ M15, Tn10 (Tetr)]	Agilent Technologies, Heilbronn
HD-MY-Z (ACC 346)	Humane Hodgkin-Lymphom Zelllinie, Suspensionzellen, CD30 ⁺	DSMZ, Braunschweig
HEK293-6E	Humane embryonale Nierenzelllinie	(Durocher et al., 2002)
Hyperphage	Helferphage, M13K07 Δ gIII	(Rondot et al., 2001)
Karpas299 (ACC 31)	Humane T-Zell-Lymphom-Zelllinie, Suspensionzellen, CD30 ⁺	DSMZ, Braunschweig
L-428 (ACC 197)	Humane Lymphom-Zelllinie, Suspensionzellen, CD30 ⁺	DSMZ, Braunschweig
L-540 (ACC 72)	Humane Lymphom-Zelllinie, Suspensionzellen, CD30 ⁺	DSMZ, Braunschweig
M13K07	Helferphage	(Vieira und Messing, 1987)

3.1.7 Plasmide

Tabelle 3.7: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Verwendung	Referenz/Herkunft
pHAL14	scFv-Phagen-Display	(Hust et al., 2009)
pHAL14-IIB6	Phagen-Display und Expression des LT12-IIB6 scFvs	(Tolakis, 2004)
pHAL14-HT186-B7	Phagen-Display und Expression des HT186-B7 scFvs	(Thie et al., 2011)
pHAL14-HT186-D11	Phagen-Display und Expression des HT186-D11 scFvs	(Thie et al., 2011)
pHAL14-HT186-G2	Phagen-Display und Expression des HT186-G2 scFvs	(Thie et al., 2011)
pHAL14-SH313-B5	Phagen-Display und Expression des SH313-B5 scFvs	(Wezler et al., 2012)
pHAL14-SH313-F9	Phagen-Display und Expression des SH313-F9 scFvs	(Wezler et al., 2012)
pHAL21	scFab Δ C-Phagen-Display	(Hust et al., 2007b)
pHAL21-HT186-D11	Phagen-Display und Expression des HT186-D11 scFab Δ C	(Droste, 2009)
pHAL21- SH313-B5	Phagen-Display und Expression des SH313-B5 scFab Δ C	(Droste, 2009)

pHAL21- SH313-F9	Phagen-Display und Expression des SH313-F9 scFabΔC	(Droste, 2009)
pHAL13	FabΔC-Phagen-Display	AG Dübel
pCMV-hlgG1-Fc-CD30ex	Quelle für das Gen CD30	(Menzel et al., 2008)
pCSE2.5-His	Eukaryotische Expression His getaggtter Proteine	AG Dübel
pCSE2.5-hlgG1-Fc-XP	Eukaryotische Expression humaner scFc-Fc uns sclgG Fusionsantikörper	(Schirrmann et al., 2010)
pCSH1c	Eukaryotische Expression humaner IgG-HC	AG Dübel
pCSL3l	Eukaryotische Expression humaner IgG-LC	AG Dübel

3.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 3.8: Verwendete Oligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz	Verwendung
11	MhgIII_r	CTAAAGTTTTGTCGTCTTTC C	Amplifikation von Antikörpergenen aus pHAL Vektoren, <i>Error-Prone</i> -PCR
14	MHCoIE1	CCCAATACGCAAACCGCC	Amplifikation von Antikörpergenen aus pHAL Vektoren, <i>Error-Prone</i> -PCR
83	Jlseq-Hcmv1_f	CTAACTAGAGAACCCACTG C	Amplifikation von Antikörpergenen aus pCSL3l
100	MHRBS-LC_f	CATTAAAGAGGAGAAATTA ACC	Konstruktion pHAL34
125	MHLacZ-Pro_f	GGCTCGTATGTTGTGTGG	Amplifikation von Antikörpergenen aus pHAL Vektoren, <i>Error-prone</i> -PCR
231	MHBGH_r	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Amplifikation von Antikörpergenen aus pCSL3l
241	Mkmyc_r	GATCCTCTTCTGAGATGAG	Amplifikation von Antikörpergenen aus pHAL Vektoren
242	MkpelB_f	GCCTACGGCAGCCGCTGG	Amplifikation von Antikörpergenen aus pHAL Vektoren, <i>Error-Prone</i> -PCR
410	Tor-pCMV-mlgG01-FC-seq-f	CACTTTGCCTTTCTCTCC	Amplifikation von Antikörpergenen aus pCSE2.5-hlgG1-Fc-XP
411	Tor-pCMV-mlgG01-Fc-seq-r	CAGATGGCTGGCAACTAG	Amplifikation von Antikörpergenen aus pCSE2.5-hlgG1-Fc-XP
540	IIB6-Aff-2-fwd	GCCGCTGGCTTGCTGCTG CTGGCAGCTCAGCCGGCC ATGG	Amplifikation von Antikörpergenen aus pHAL Vektoren, <i>Error-Prone</i> -PCR

3 Material und Methoden

541	IIB6-Aff-2-rev	GTTCGTCGGCCCCGTGATG GTGATGATGATGAGCGGC GGC	Amplifikation von Antikörpergenen aus pHAL Vektoren, <i>Error-Prone</i> -PCR
544	HT-gIII-Beginn-1-rev	TAAACAACCTTTCAACAGTTT CAGCT	Amplifikation von Antikörpergenen aus pHAL Vektoren, <i>Error-Prone</i> -PCR
977	PaD_B5_MfeI_f	ATCTCAATTGGTGCAGTCT GGGGCTG	Amplifikation SH313-B5 V _H zur Klonierung in pHAL21/26/34
978	PaD_B5F9_NheI_r	ATCGGCTAGCTGAAGAGA CGGTGACC	Amplifikation SH313-B5/ SH313-F9 V _H zur Klonierung in pHAL21/26/34
979	PaD_B5_NcoI_f	ATCGCCATGGCCCTGCCTG TGCTGACTC	Amplifikation SH313-B5 V _L zur Klonierung in pHAL21/26/34
980	PaD_B5_Hind_r	GTCAAAGCTTGGTCCCACC GCCGAAGA	Amplifikation SH313-B5 V _L zur Klonierung in pHAL21/26/34
981	PaD_F9_MfeI_f	ATCTCAATTGGTGCAGTCT GGGTCTG	Amplifikation SH313-F9 V _H zur Klonierung in pHAL21/26/34
982	PaD_F9_NcoI_f	ATCTCCATGGCCCAGCCTG GGCTGACTC	Amplifikation SH313-F9 V _L zur Klonierung in pHAL21/26/34
983	PaD_F9_Hind_r	ACTGAAGCTTGGTCCCTCC GCCGAATACC	Amplifikation SH313-F9 V _L zur Klonierung in pHAL21/26/34
1282	MiS_HAL26_r2	CCTTGCTGCAGACGCGTCT TATTATGAACATTCCGTAGG GGCAACTGT	Konstruktion pHAL26
1285	MiS_CH1dC_r	GATGAGCGGCCGCAGATT TGGGCTCAACTTTC	Konstruktion pHAL34
1315	AF110.1_B12_HC_NheI_r	CCGAGCGCTAGCTGAAGA GACGGTGACCATTGTCCC	Amplifikation V _H zur Klonierung in pCSH1c
1451	SH313-F9_VL_for	GATCCACCGGTCAGCCTG GGCTGACTCAG	Amplifikation V _L zur Klonierung in pCSL3I
1453	SH313-B5/F9-VH_for	GATCGCGCGCACTCCCAG GTGCAGCTGGTGCAG	Amplifikation V _H zur Klonierung in pCSH1c
1475	AF_HT186D11-LC_DraIII- rev	AGTGACACTTGGTGCAGC CTTGGGCTGACC	Amplifikation V _L zur Klonierung in pCSL3I
1503	AF_HT186D11-LC_AgeI_f	TTGGTGCTAGCTGAGGCG ACGGTGACCAG	Amplifikation V _L MUC1- spezifischer Klon zur Klonierung in pCSH1c
1504	AF_HT186D11- HC_BssHII_f	CACAGGCGCGCACTCCCA GATGCAGCTGGTACAG	Amplifikation V _H des HT186- B7 zur Klonierung in pCSH1c
1505	AF_HT186D11-HC_NheI_r	TTGGTGCTAGCTGAGGCG ACGGTGACCAG	Amplifikation V _H des HT186- B7 und HT186-G2 zur Klonierung in pCSH1c
1665	MiS_HT186-G2- HC_BssHII_f	CACAGGCGCGCACTCCCG GATGCAGCTGGTACAG	Amplifikation V _H des HT186- G2 zur Klonierung in pCSH1c
1666	MiS_IIB6-HC_BssHII_f	CACAGGCGCGCACTCCCA GATGCAATTGGTACAG	Amplifikation V _H des IIB6 zur Klonierung in pCSH1c
1667	MiS_IIB6-HC_NheI_r	TTGGTGCTAGCTGAGGAG ACGGTGACCAG	Amplifikation V _H des IIB6 zur Klonierung in pCSH1c

3.1.9 Enzyme

Tabelle 3.9: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
CIP (Calf-intestinal alkaline phosphatase)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
DnaseI	Fermentas, St. Leon-Roth
GoTaq® DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Mutazyme II DNA-Polymerase	Agilent Technologies, Heilbronn
Phusion DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim
Trypsin	Carl Roth, Karlsruhe

3.1.10 Antikörper und Antigene

Tabelle 3.10: Verwendete Antigene

Antigen	Hersteller/Herkunft
BSA	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
MUC1-Peptid (32 AS)	Chemische Biologie, HZI, Braunschweig
CD30-hlgG1-Fc (extrazelluläre Domäne)	AG Dübel
CD30 (extrazelluläre Domäne)	Miriam Steinwand

Tabelle 3.11: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller/Herkunft
Maus- α -c-myc-IgG, 9E10/21	1:1000	AG Dübel
Maus- α -pIII, PSKAN3	1:2000	MoBiTec
Maus- α -M13-HRP, 27-9412-01	1:5000	GE-Healthcare, München
Ziege- α -human-IgG (polyklonal), 1761	1:5.700	Sigma-Aldrich, München
Ziege- α -Maus-IgG-AP (Fc-spez., polyklonal), 109-055- 098	1:10.000	Sigma-Aldrich, München
Ziege- α -Maus-IgG-HRP (Fc-spez., polyklonal), A0178	1:20.000	Sigma-Aldrich, München
Ziege- α -Maus-IgG-HRP (Fab-spez., polyklonal)	1:10.000	Sigma-Aldrich, München
Ziege- α -human-IgG-HRP (Fc-spez., polyklonal), A0170	1:10.000	Sigma-Aldrich, München
Ziege anti-Human IgG-FITC (Fc-spez., polyklonal) 105-095- 098	1:100	Dianova, Hamburg

3.1.11 Protein- und DNA-Standards

Tabelle 3.12: Verwendete Standards für Proteine und DNA

Bezeichnung	Hersteller
N Protein Standard SL	Dade Behring, Marburg
Precision Protein™ StrepTactin-HRP	Bio-RaD, München
Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards	Bio-RaD, München
Precision Plus Protein™ unstained Standards	Bio-RaD, München

3.1.12 Software und Datenbanken

Tabelle 3.13: Verwendete Software und Datenbanken

Name	Referenz	Verwendung
BIAevaluation 4.1	GE Healthcare Life Science	Auswertung von Bindungskintiken
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	Vergleich von DNA-Sequenzen
CXP Cytometer 2.2	Beckman Coulter	Messung Durchflusszytometrie
EMBOSS Transeq	http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html	Übersetzung von DNA- in Proteinsequenzen
FinchTV 1.4.0	Geospiza Inc.	Auswertung von DNA-Sequenzen
FlowJo 7.2.5	Treestar	Auswertung Durchflusszytometrie
ImageLab 4.0.1	BioRaD	Darstellung von Agarose-, SDS-Gelen und Immunostains
Intas Gelddocumentation	Intas	Darstellung von Agarosegelen
NanoDrop ND-1000	Coleman Technologies	Analyse von Nukleinsäure- und Proteinkonzentrationen
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Recherche von Literatur, Protein- und Gensequenzen
OpenOffice 3.1	http://www.openoffice.org/	Protokolle, Präsentationen, Berechnungen, Zeichnungen
Unicorn 5.1	GE-Healthcare, München	Analyse von SEC-Daten
VBASE2	http://www.vbase2.org/	Analyse von Antikörpersersequenzen
Vector NTI Advance® 11	Invitrogen (USA)	Erstellen von Vektorkarten
Zotero 4.0.14	http://zotero.org	Literaturverwaltung

3.2 METHODEN

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* erfolgte mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab, Erlangen) nach Herstellerangaben. Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das Plasmid DNA Purification Kit NucleoBond® Xtra Midi (Machery und Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die präzipitierte DNA wurde in 250-500 µL H₂O aufgenommen. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

Amplifikation von DNA

Zur Amplifikation von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) verwendet (Mullis et al., 1986). Die Zusammensetzung der unterschiedlichen PCR-Reaktionen, sowie deren Temperaturverläufe sind im Folgenden dargestellt. Die Annealing-Temperatur *x* und die Elongationszeit *y* wurden nach Angaben des Herstellers der DNA-Polymerase berechnet.

Standard-PCR

Tabelle 3.14: Zusammensetzung und Temperaturprofil von Standard-PCRs.

x, Annealing-Temperatur; *y*, Elongationszeit

Komponente	Volumen [µL]	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Matritzen-DNA [1 ng]	1	98	30
5xPhusion-Puffer	10	98	10
40 µM dNTPs (je 10 µM)	1	<i>x</i>	20
Forward Primer (10 pmol/µL)	2,5	72	<i>y</i>
Reverse Primer (10 pmol/µL)	2,5		
Phusion-DNA-Polymerase (2 U/µL)	0,5	72	600
H ₂ O	32,5	16	∞

3 Material und Methoden

Error-prone-PCR

Die *Error-prone*-PCR ermöglichte Zufallsmutationen in die scFv-Gene SH313-B5 und -F9 einzufügen. Dafür wurde das GeneMorph® Random Mutagenese Kit II eingesetzt. Laut Hersteller führt die darin enthaltene Mutazyme-DNA-Polymerase bis zu 16 Punktmutationen pro 1000 bp ein. Es wurden drei nacheinander folgende PCR-Runden durchgeführt, wobei in der 1. Runde die Primer mit den Nummern 14 bzw. 11 und für die 2. und 3. Runde die Primer 125 und 544 zum Einsatz kamen (Nested-PCR).

Tabelle 3.15: Zusammensetzung und Temperaturprofil von *Error-prone*-PCRs

Komponente	Volumen [μL]	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]
Matritzen-DNA [0,05 ng]	1	95	120
5x Puffer	2,5		
40 mM dNTPs (je 10 μM)	1	95	60
Forward Primer (10 pmol/ μL)	0,5	65	60
Reverse Primer (10 pmol/ μL)	0,5	72	70
Mutazyme II DNA-Polymerase (2,5 U/ μL)	1	72	600
H ₂ O	19,5	16	∞

25 x

Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR (KPCR) diente der Überprüfung von Klonierungen oder Antikörpergenbibliotheken. Dazu wurde eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte mittels einer sterilen Pipettenspitze entnommen und im KPCR-Ansatz resuspendiert. Während dem Denaturierungsschritt bei 98 $^{\circ}\text{C}$ werden die Bakterienzellen aufgeschlossen und die enthaltende DNA steht als Matrize für die PCR zur Verfügung.

Tabelle 3.16: Zusammensetzung und Temperaturprofil von Kolonie-PCRs.

x, Annealing-Temperatur; y, Elongationszeit

Komponente	Volumen [μL]	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]
Bakterienkolonie	-	98	30
10x GoTaq-Puffer	2		
40 mM dNTPs (je 10 μM)	0,5	98	10
Forward Primer (10 pmol/ μL)	0,5	x	20
Reverse Primer (10 pmol/ μL)	0,5	72	y
GoTaq-DNA-Polymerase (2 U/ μL)	0,05	72	600
H ₂ O	16,45	16	∞

30 x

Reinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte bzw. DNA-Fragmente aus präparativen Agarosegelen wurden mit dem NucleoSpin®Extract Kit II (Machery Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei $\lambda=260$ nm bzw. 280 nm bestimmt (Nanodrop ND-Spektrometer, Peqlab, Erlangen). Reine, doppelsträngige DNA hat bei einer Konzentration von 50 µg/mL eine Absorption von $A_{260}=1$.

Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA nach Größe und Konformation erfolgte mittels Elektrophorese von 0,5-1,5 % (w/v) Agarosegelen mit 25 µg/mL Ethidiumbromid, bei einer Spannung von 90-130 V und einer Stromstärke von 300 mA.

Präzipitation von DNA

Zur Präzipitation von DNA-Lösungen wurde diese auf 100 µL mit H₂O aufgefüllt und mit 10 µL 3 M Natriumacetat und 250 µL Ethanol 2 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Durch einen fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 16.000xg und 4°C wurde die DNA pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (s.o.) wurde das DNA-Pellet getrocknet und in der gewünschten Lösung (z.B. 30 µL H₂O) aufgenommen.

Enzymatische Restriktion von DNA

Durch den Einsatz verschiedener Enzyme, wie Desoxyribonuklease (DNase) oder Restriktionsendonukleasen vom Typ II wurde DNA in kleinere Molekülketten gespalten. Hierzu wurde DNA mit einem oder mehreren Enzymen mehrere Minuten bis 18 h beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme, wenn möglich, nach den Angaben des Herstellers hitzeinaktiviert. Exemplarische Reaktionsansätze sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

3 Material und Methoden

Tabelle 3.17: Zusammensetzung von Restriktionsansätzen

Komponente	Volumen [µL]	Komponente	Volumen [µL]
DNA (Vektor 5 µg, Insert 1 µg)	10	DNA (4 µg)	20
Restriktionsenzym I (10 U/µL)	1	Reaktionspuffer mit MgCl ₂ , 10x	1
Restriktionsenzym II (10 U/µL)	1	DNAseI (0,025 U)	2,5
Reaktionspuffer NEB1-4, 10x	5	H ₂ O	6.5
BSA 100x (NEB)	0,5		
H ₂ O	33		

DNA-Dephosphorylierung

Um eine Religation von linearisierten DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau zu verhindern, wurden eine Dephosphorylierung der endständigen 5' Phosphatgruppen durchgeführt. Dies erfolgte durch die Zugabe von 0,5 µL *Calf intestine phosphatase* (CIP, 10 U/µL). Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde erneut 0,5 µL CIP hinzugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA gereinigt.

Ligation von DNA-Fragmenten

Durch die Zugabe von T4-DNA-Ligase wurden linearisierte DNA-Fragmente ligiert (Tabelle 3.18). Bei der Ligation von DNA-Fragmenten zur Generierung von Antikörpergenbibliotheken wurde 1 µg Vektor in einem 100 µL Ligationsansatz eingesetzt. Es wurde ein Vektor:Insert Verhältnis von 1:3 eingesetzt, das nach folgender Formel berechnet wurde:

$$\text{Masse Insert [ng]} = \frac{\text{Masse Vektor [ng]} * \text{Länge Insert [kb]}}{\text{Länge Vektor [kb]}} * \text{molares Verhältnis Insert/Vektor}$$

Nach der Inkubation bei 16°C ü.N. wurde der Ligationsansatz bei 65°C für 10 min inaktiviert.

Tabelle 3.18: Zusammensetzung von Ligationen

Kompetente	Volumen [µL]
Vektor (50 ng)	2
Insert (Vektor:Insert= 1:3)	2
T4-DNA-Ligase (3 U/µL)	0.33
Ligasepuffer, 10x	1
H ₂ O	4.67

Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA-Plasmiden wurden durch den Dienstleister GATC-Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

3.2.2 Mikrobiologische Methoden

Sterilisation

Kulturmedien, Medienzusätze, Puffer und Lösungen wurden bei 121°C und 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert. Hitze sensitive Substanzen wurden mittels Filters mit 0,2 µm Durchmesser filtriert und dem Medium unter sterilen Bedingungen zugefügt.

Kultivierung von Bakterien

Plattenkulturen wurden hergestellt, indem Bakterien aus Glycerinkulturen mit einer sterilen Impföse entnommen und auf einer 2xYT-Agar-Platte mit dem jeweiligen Antibiotika-Zusatz ausgestrichen wurden. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C über Nacht (ü.N.). Zur Lagerung bei 4°C wurden diese mit Parafilm abgedichtet.

Zur Erstellung von Flüssigkulturen wurden Bakterien mit einer sterilen Impföse aus Glycerin- oder Plattenkulturen entnommen und in Medium mit entsprechendem Antibiotikum-Zusatz im Schüttelkolben bei 37°C und 250 rpm (Multitron, Infors) ü.N. (ca. 14-18 h) inkubiert.

Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen

Durch photometrische Messung (Biochrome, Cambridge) der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm und Kulturmedium als Referenz wurde die Zelldichte von Bakterien bestimmt. Eine OD von 0,5 entspricht bei *E. coli* etwa 5×10^8 Zellen/mL.

Lagerung von Bakterien

Glycerinstocks wurden aus Kultursuspensionen mit 20 % (v/v) Glycerin zur permanenten Lagerung bei -80°C angelegt.

Herstellung chemo-kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von *E. coli* XL1-blue MRF' mittels Hitzeschock wurden kompetent *E. coli*-Zellen hergestellt (Sambrook und Russell, 2000). 100 mL 2xYT-Medium mit dem jeweiligen Antibiotika-Zusatz wurden mit einer Übernacht-Kultur (ÜNK) auf $OD_{600} > 0,1$ inokuliert und bei 37°C und 250 rpm bis zu einer $OD_{600} \sim 0,5$ inkubiert. Die Zellen wurden bei 3220xg und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in 15 mL eiskaltem TFB1 vorsichtig resuspendiert. Nach einer 90 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt wie oben beschrieben. Das Zellpellet wurde in 4 mL eiskaltem TFB2 resuspendiert. Für die Lagerung bei -80°C wurden 50 µL Aliquots in flüssigen Stickstoff schockgefroren.

Transformation von *E. coli*

Hitzeschock

Für das Einbringen von Ligationen oder Plasmiden in *E. coli* XL1-blue MRF' wurden 50 µL chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen vorsichtig aufgetaut und mit den entsprechenden DNA-Elementen für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 1 min und 42°C, danach wurde 2 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde der Transformationsansatz mit 900 µL SOC-Medium bei 37°C für 1 h und 600 rpm inkubiert. Nach dem Ausplattieren auf entsprechenden 2xYT-Agarplatten erfolgte die Inkubation bei 37°C ü.N. Dann erfolgte die Zugabe von 950 µL auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium zu den Zellen und eine Inkubation dieses Ansatzes bei 600 rpm und 37°C für 1 h. Aus 10 µL wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, die auf 2xYT-Selektivagarplatten ausplattiert wurden. Der restliche Ansatz wurde auf 25 x 25 cm Selektivagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C ü.N. inkubiert.

Elektroporation

Für die Herstellung von Antikörpergenbibliotheken wurden Ligationsansätze in *E. coli* XL1-blue MRF' durch Elektroporation eingebracht. Die Ligationsansätze wurden zuvor präzipitiert, in 30 µL H₂O resuspendiert und mit 50 µL *E. coli* 1 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Küvette (Elektrodenabstand 1 mm) gegeben. Die Transformation erfolgte durch einen elektrischen Puls von 1,7 kV für ca. 5 ms.

Herstellung von M13-Antikörperphagen

Mit einer Übernachtskultur von Phagemid tragenden Bakterien in 2xYT-GA-Medium wurde die Hauptkultur von 30 mL 2xYT-GA inokuliert. Ebenso dienten abgeschwemmte Kolonien von Agarplatten als Inokulum. Die Hauptkultur wurde bis zum Erreichen von OD~0,5 bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Fünf mL (Panning) bzw. 25 mL (Antikörperphagen-Bibliotheken) der Hauptkultur wurden im Verhältnis 1:20 mit M13K07 bzw. *Hyperphage* infiziert. Dieser Ansatz wurde zunächst 30 min bei 37°C und anschließend für weitere 30 min bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 3220xg für 10 min sedimentiert, in 30 bzw. 400 mL 2xYT-AK-Medium aufgenommen und ü.N. Bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Der Phagen enthaltende Überstand wurde von den Zellen durch Zentrifugation bei 3220xg und 4°C für 10 min abgetrennt. Für die Herstellung von Antikörperphagen-Bibliotheken wurden die Phagen mittels Inkubation mit 1/5 Volumen PEG/NaCl-Lösung auf einer Wippe bei 4°C für 1 h gefällt. Anschließend erfolgte eine Sedimentation der Phagen bei 10.000xg bei 4°C für 1 h. Die sedimentierten Phagen wurden in 10 mL Phage Dilution Buffer aufgenommen. Noch enthaltene Zellen und Zelltrümmer wurden bei 16.000xg und 4°C für 30 min pelletiert. Die im Überstand befindlichen Phagen wurden mit 1/5 Volumen PEG/NaCl-Lösung für 20 min auf der Wippe gefällt und anschließend bei 16.000xg und 4°C für 30 min pelletiert. Das Pellet wurde in 1 mL Phage Dilution Buffer resuspendiert und bei 16.000xg und 1 min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde in Mikroschraubröhrchen bei 4°C aufbewahrt.

Selektion von Antikörpern aus Antikörperphagen-Bibliotheken

Zur Selektion von CD30-spezifischen Antikörperfragmenten aus den mutierten Antikörperphagen-Bibliotheken der Antikörperklone SH313-B5 und -F9 wurden Pannings unter stringenten Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden 100 ng CD30-hFc auf der Oberfläche der Kavitäten von MTP-Stripes (Nunc, Maxisorp) in 150 µL PBS ü.N. bei 4°C adsorptiv immobilisiert. Die Antigenlösung wurde verworfen und unspezifische Bindungsstellen mit M-PBS-T für 1 h bei Raumtemperatur (RT) abgesättigt. Ebenso wurde pro Ansatz eine Kavität der MTP mit Panningblock inkubiert, hier erfolgte die Präinkubation von 5×10^{10} - 5×10^{11} der Antikörperphagen-Bibliotheken in 150 µL Panningblock für 1 h, um unspezifisch bindende Antikörperphagen zu entfernen. Nach dreimaligen Waschen mittels ELISA-Washer mit PBS-T erfolgte der Transfer der präinkubierten Phagen in die mit dem Antigen beschichtete Kavität. Nach einer

3 Material und Methoden

einstündigen Inkubation erfolgte ein weiterer Waschschriff mittels ELISA-Washer. Danach erfolgte, falls beschrieben, die einstündige Inkubation des Antigens, um eine erneute Bindung bereits dissoziierter Antikörperphagen zu verhindern. Nach einem weiteren Waschschriff wurden gebundene Phagen enzymatisch mittels 200 µL 10 µg/mL Trypsin für 30 min bei 37°C eluiert.

Mit den eluierten Phagen erfolgte eine Titerbestimmung, dadurch erhaltenen Kolonien wurden zur Produktion löslicher Antikörperfragmente genutzt, die mittels ELISA analysiert wurden.

Titerbestimmung von M13-Phagen

Zur Bestimmung der Zahl infektiöser Phagen wurde die Anzahl der Einzelkolonien nach Infektion von *E. coli* XL1-Blue MRF' bestimmt.

Eine *E. coli* XL1-Blue MRF' Hauptkultur in 2xYT-Medium wurde bei 37°C und 250 rpm bis zu einer $OD_{600} \approx 0,5$ inkubiert. 10 µL der Verdünnungsreihen der Phagensuspensionen in PBS wurden mit 50 µL der *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen 30 min bei 37°C inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf 2xYT-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotika-Zusatz ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Durch die Auszählung der Einzelkolonien wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung der Phagentiter bestimmt.

Produktion löslicher Antikörperfragmente

Für die Produktion von Antikörperfragmenten in Mikrotiterplatten wurden zunächst ÜNK hergestellt. Hierzu wurden jeweils 170 µL 2xYT-GA mit einem Antikörperklon inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 850 rpm im Mikrotiterplattenschüttler ü.N. Am nächsten Tag wurden jeweils 180 µL 2xYT-GA mit 10 µL der ÜNK angeimpft und für 2 h bei 37 °C und 850 rpm inkubiert. Daraufhin wurde die Bakterien bei 3320xg (Eppendorf 5810R, Rotor A-4-81, Mikrotiterplattengehänge) pelletiert. Der Überstand wurde durch phosphatgepuffertes 2xYT-A mit 50 µM IPTG ersetzt. Anschließend wurde ü.N. bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Zentrifugation wie oben beschrieben durchgeführt. Die Überstände wurden zur Analyse mittels ELISA eingesetzt.

3.2.3 Zellbiologische Methoden

Kultivierung von humanen Zellen

Das Medium der Zellen wurden alle 2-3 Tage gewechselt, ebenso fand eine Verdünnung der Zellen auf die von der Bezugsquelle angegebene Zellzahl statt. Dazu wurden die Zellen 5 min bei 500xg bei RT zentrifugiert, das Medium verworfen und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerkammer bestimmt. Die Zellen wurden in 13 mL Medium in einer Zelldichte von $1-5 \times 10^5$ Zellen/mL eingesät.

Tabelle 3.19: Verwendeten Zelllinien und dessen Kultivierungsbedingungen

Zelllinie	Kultivierungsmedium	Kultivierungsbedingungen
HD-MY-Z	RPMI + 8% FCS + 1% P/S	37°C, 5% CO ₂ , 95% Luftfeuchtigkeit
HEK293-6E	F17 + 25 µg/mL G418 + 7,5 mM L-Glutamin + 0,1% Pluronic F-68	37°C, 5% CO ₂ , 95% Luftfeuchtigkeit, 110 rpm
Karpas299	RPMI + 8% FCS + 1% P/S	37°C, 5% CO ₂ , 95% Luftfeuchtigkeit
L-428	RPMI + 8% FCS + 1% P/S	37°C, 5% CO ₂ , 95% Luftfeuchtigkeit
L-540	RPMI + 20% FCS + 1% P/S	37°C, 5% CO ₂ , 95% Luftfeuchtigkeit

Auftauen, Einfrieren und Lagerung humaner Zellen

Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in Cryoröhrchen in flüssigen Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Zellen vorsichtig in 12 mL Kultivierungsmedium resuspendiert. Nach der Zentrifugation der Zellen bei 500xg für 5 min bei RT wurde das Zellpellet in 13 mL frischem Kultivierungsmedium resuspendiert und in eine Kulturschale (bzw. Erlenmeyerkolben bei HEK293-6E-Zellen) ausgesät.

Zur Lagerung der Zellen wurden diese zunächst bei 500xg und 4°C für 5 min zentrifugiert und dann in Kulturmedium mit 40% FCS resuspendiert. Danach erfolgte die vorsichtige und langsame Zugabe des gleichen Volumen Kultivierungsmedium mit 20% DMSO auf Eis. Die Zelllösung wurde in Cryoröhrchen überführt und 24 h bei -80°C eingefroren. Danach erfolgte die Lagerung in flüssigen Stickstoff.

Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Zur Bestimmung von Zellzahl und Zellviabilität wurden Zellsuspensionen mit Trypanblau versetzt und in eine Neubauerzählkammer gegeben. Tote Zellen wurden durch das Trypanblau angefärbt und für die Bestimmung von Zellzahl und Zelldichte

nicht berücksichtigt.

Eukaryotische Produktion von Proteinen

Die Produktion von IgGs, scFv-Fc-Fusionsantikörpern und scIgGs wurde in HEK293-6E-Zellen durchgeführt. Die jeweilige Plasmid-DNA (0,5 µg je 1 mL Transfektionsvolumen) wurde mit dem kationischen Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI, 2,5 µg je 1 mL Transfektionsvolumen) in Transfektionsmedium gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Das gewünschte Volumen von HEK293-6E-Zellen mit einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/mL wurde mit der DNA-PEI-Mischung transfiziert. Die Inkubation erfolgte im Erlenmeyerkolben bei 37°C, 5% CO₂ und 110 rpm. Nach 48 h erfolgte gemessen am Kulturvolumen die Zugabe des gleichen Volumens F17-Medium mit 0,1% Trypton. Die Zellen wurden für weitere 66-96 h kultiviert. Dann wurden die Zellen bei 1000xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Produktionsüberstand wurde filtriert (0,45 µm Filter) und entgast.

Durchflusszytometrie

Die verschiedenen CD30-spezifischen Antikörper wurden mittels Durchflusszytometer bezüglich ihrer Bindung an CD30⁺ Lymphomzellen verglichen. Dazu wurden die CD30⁺-Zellen Karpas299, L-428 und L-540 bzw. die CD30⁻-Zellen HD-MY-Z und HEK293-6E verwendet. Die verwendeten Lösungen wurden auf 4°C gekühlt. Die Zellen wurden im Polypropylenröhrchen bei 250xg für 6 min und 4°C sedimentiert und so in kaltem FACS-Puffer resuspendiert, dass eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen/mL entsteht. 100 µL der Zellsuspension werden pro Kavität einer MTP mit U-Boden gegeben. Der nächste und alle folgenden Zentrifugationsschritte erfolgen bei 290xg für 5 min und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit je 25 µL der kalten Antikörperlösung resuspendiert und 15 min bei 4°C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 200 µL kalten FACS-Puffer und ein Zentrifugationsschritt wie oben. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Zellen in je 25 µL 1:100 Ziege anti-Human IgG-FITC resuspendiert und 15 min bei 4°C inkubiert. Es wurden 200 µL FACS-Puffer hinzu gegeben und die Zellen wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Zellen in 190 µL kalten FACS-Puffer resuspendiert. 190 µL Propidiumiodidlösung wurden in FACS-Röhrchen vorgelegt und die Zellsuspension wurde hinzu pipettiert. Propidiumiodid dringt in tote Zellen ein (Absorption 488 nm, Emission 590 nm). Die Zellen wurden im Durchflusszytometer Cytomics FC 500 bei

einer Anregungswellenlänge von 488 nm analysiert. Die FITC-vermittelte Fluoreszenzintensität wurde bei 525 nm (FL1) gemessen. Für jede Probe wurden 10.000 Messereignisse untersucht, die mit FlowJo 7.2.5 ausgewertet wurden. Es wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (engl.: *mean fluorescence intensity*, MFI) ermittelt. Das Verhältnis der MFI der Proben zur MFI der Kontrolle (entsprechend behandelte CD30-Zellen oder entsprechende Zellen, die nur mit Sekundärantikörper behandelt wurden) wurde ermittelt.

3.2.4 Biochemische Methoden

Reinigung von Proteinen

IgGs, scFv-Fc-Fusionsantikörper und scIgGs wurden aus dem Produktionsüberstand mittels Protein A Affinitätschromatographie mit Hilfe des Profinia-Systems gereinigt. Nach der Entgasung der Überstände (Porengröße des Filters: 0,45 µm) wurden die Proben mit 1/5 Volumen 5x Protein A Bindepuffer versetzt und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min über eine 1 mL Protein A Säule geleitet. Es erfolgte ein Waschschriff von 30 Säulenvolumen mit Protein A Bindepuffer und eine Elution mit vier Säulenvolumen Citratpuffer. Die Proben wurden dann mit Hilfe einer 10 mL Entsalzungssäule auf PBS umgepuffert. Die Elution wurde filtriert (Porengröße des Filters: 0,2 µm) und bei 4°C gelagert.

Quantifizierung von Proteinen

Bei bekannten Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten wurde die Konzentration von Proteinen photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=280$ nm ermittelt. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung von Proteinkonzentration mittels ELISA (siehe *human capture* ELISA) unter Verwendung eines Standards für humane Antikörper (N Protein Standard SL). Außerdem wurde die Proteinkonzentration mittels ECL-gefärbten Immunoblot (siehe Immunoblot) bestimmt. Dazu wurde als Referenz eine Probe bekannter Konzentration (ermittelt durch photometrische Bestimmung, s.o.) mit den Proben unbekannter Konzentration verglichen. Die Auswertung erfolgte durch die Software ImageLab.

SDS-PAGE

Durch die diskontinuierliche SDS-PAGE (engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Laemmli, 1970) erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen. Für reduzierende Bedingungen wurden die Proteinproben mit 1/5 Volumen 5x Laemmli-Puffer versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Für nicht reduzierende Bedingungen wurden die Proben mit 1/5 Volumen 5x Laemmli-Puffer ohne β -Mercaptoethanol für 10 min bei 56°C inkubiert. Die Proben wurden auf ein 10-12%iges SDS-Gel mit 10%igen Sammelgel aufgetragen und bei einer Stromstärke von 30 mA je Gel und einer Spannung von 300 V so lange aufgetrennt, bis das Bromphenolblau das Ende des Gels erreichte (ca. 45 min). Nach der Coomassiefärbung konnte durch den Vergleich der Höhe der Proteinbanden der Proben mit einem Protein Standard die relative Molekülmasse abgeschätzt werden.

Coomassiefärbung

Das Trenngel wurde in ca. 20 mL Coomassie®Färbelösung kurz in der Mikrowelle aufgekocht und 10 min bei RT auf der Wippe gefärbt. Die Färbelösung wurde durch Entfärbelösung ersetzt und ebenso kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Diese wurde bis zur Entfärbung der proteinfreien Gelmatrix auf dem Gel belassen. Das Gel wurde dann mit Wasser gespült und zur Dokumentationszwecken eingescannt.

Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben konnte mittels Western Blot (WB) im *Semi-dry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Dazu wurden drei in WB-Laufpuffer getränkte Filterpapiere luftblasenfrei auf die Elektrodenplatte, gefolgt von der in Ethanol aktivierte PVDF-Membran gelegt. Das Trenngel und drei weitere getränkte Filterpapiere wurden luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Für den Transfer der Proteine auf die Membran wurde eine Spannung von 20 V und eine Stromstärke von 330 mA pro Gel für 40 min angelegt.

Immunfärbung

Die auf der Membran übertragenen Proteine (Western Blot) wurden mittels Immunfärbung nachgewiesen. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation in M-PBST bei RT (bzw. ü.N. bei 4°C) auf der Wippe. Alle weiteren Inkubationen fanden bei RT statt. Der proteinspezifische

Primärantikörper in M-PBST wurde 1 h auf der Wippe inkubiert. Es folgten drei Waschschrte, zuerst kurz in PBS, dann 5 min mit PBS-T und erneut kurz in PBS. Dann wurde der Sekundärantikörper in M-PBST auf der Membran 1 h inkubiert. Dann erfolgten drei Waschschrte wie oben. Je nachdem, ob als Sekundärantikörper ein Konjugat mit Alkalischer Phosphatase (AP) oder Meerrettichperoxidase (engl. *horse radish peroxidase*, HRP) verwendet wurde erfolgte die Entwicklung.

Entwicklung von AP-gefärbten Western Blots

Die Membran wurde 5 min in AP-Substratpuffer äquilibriert. Dann erfolgte die Entwicklung durch die Inkubation in AP-Substratlösung bis zur ausreichenden Färbung. Die Reaktion wird durch Waschen mit H₂O abgestoppt.

Entwicklung von HRP-gefärbten Western Blots (ECL-Blots)

Die Membran wurde mit Substratlösung LumiGlo (1/20 Lösung A + 1/20 Lösung B) 1 min inkubiert. Die obere Seite des Blots wurde kurz trocken getupft. Dann erfolgte die Entwicklung im ChemiDoc™ mit der Software ImageLab (Einstellung: chemi high sensitivity, erstes Bild nach 30 s, Entwicklungsdauer insgesamt 300 s, 10 Bilder insgesamt).

Enzyme linked Immunosorbent-Assay (ELISA)

Antigen-ELISA

Jeweils 100 ng des Antigens (CD30 oder MUC1-Peptid) sowie BSA als Negativkontrolle wurden pro Vertiefung einer MTP (Maxisorp) in PBS ü.N. bei 4°C oder für 1 h bei RT immobilisiert. Die weiteren Inkubationen fanden bei RT statt. Die Antigenlösung wurde ausgeschlagen und die Vertiefungen der MTP mit Blockpuffer aufgefüllt und 1 h inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Nach drei Waschschrten im ELISA-Washer mit PBS-T wurden Produktionsüberstände von Antikörpern bzw. Antikörperphagen oder gereinigte Antikörper 1 h in den Vertiefungen inkubiert. Nach weiteren Waschschrten wie oben folgte die Inkubation des Primärantikörpers für 1 h. Nach erneuten Waschen wie oben wurde der Sekundärantikörper 1 h inkubiert. Wieder wurde mittels ELISA-Washer gewaschen (s.o.). Die Detektion erfolgte mit 100 µL TMB-

3 Material und Methoden

Lösung, nach ausreichenden Blaufärbung wurden die Reaktion mit 100 µL Stopplösung abgestoppt. Die Auswertung erfolgte im ELISA-Reader (Absorption bei 450 nm, Referenzmessung bei 620 nm).

Human-capture-ELISA

Beim *human-capture-ELISA* zur Ermittlung der Konzentrationen von Antikörpern und Antikörperfusionsproteinen mit humanem Fc-Teil wurde der polyklonale Antikörper Ziege- α -human-IgG 1 h bei 37°C immobilisiert. Die Vertiefungen wurden mit 200 µL 30% FCS in PBS aufgefüllt und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nach drei Waschschritten im ELISA-Washer mit PBS-T wurden Triplikate der Produktionsüberstände von Antikörpern (drei Verdünnungen je nach Antikörperausbeute, 1:100 – 1:12.800) sowie eine Verdünnungsreihe des Antikörperstandards (human N Protein Standard SL) in 1% FCS in PBS 1 h bei 37°C inkubiert. Dann erfolgten drei Waschschrritte wie oben. Der Nachweisantikörper (Ziege- α -human-IgG-HRP) in PBS wurde dazu pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Wieder erfolgte das dreimalige Waschen mittels ELISA-Washer. Dann wurden 100 µL TMB-Lösung bis zur ausreichenden Blaufärbung inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µL Stopplösung abgestoppt und die Auswertung erfolgte im ELISA-Reader (Absorption bei 450 nm, Referenzmessung bei 620 nm).

3.2.5 Biophysikalische Methoden

Größenausschlusschromatographie

Um das Aggregationsverhalten bzw. die Bildung von Multimeren der verschiedenen Antikörperformate zu untersuchen wurde die Größenausschlusschromatographie (engl.: *size exclusion chromatography*, SEC) angewandt. Diese Methode ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe bzw. Konformation. So kann die Neigung eines Proteins zur Bildung von Dimeren bzw. Multimeren bestimmt werden. Dafür wurden die Säulen Superdex200 10/300 (analytisch) und Superdex200 16/600 (präparativ) mittels ÄKTA-Purifier-System betrieben. Es wurden wenn möglich 100 µg bzw. maximal 500 µL der gereinigten Antikörper mit einer Flussrate von 0,5 mL/min und PBS als Laufpuffer auf die Säule geladen. Die Absorption bei $\lambda=280$ nm wurde

gemessen und gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Um das Retentionsvolumen mit der Masse des Proteins zu korrelieren, wurde zuvor eine Kalibrierung mit Proteinen definierter Masse durchgeführt. Für die Messung und Auswertung wurde das Programm Unicorn 5.10 verwendet.

Oberflächenplasmonresonanz

Zur Bestimmung der Affinitäten der verschiedenen Antikörperformate wurden kinetische Messungen mittels Oberflächenplasmonresonanz (engl.: *surface plasmon resonance*, SPR) durchgeführt. Das Human Antibody Capture Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet, um einen monoklonalen Maus-anti-human-IgG mittels Aminkopplung auf die Oberfläche eines CM5-Chips zu immobilisieren. 7 µg/mL der zu untersuchenden IgGs bzw. scIgGs und 5 µg/mL der scFv-Fc-Fusionen wurden bei einer Flussrate von 10 µL/min über den Chip geleitet. Die Bindung verschiedener Verdünnungen von monomeren CD30-His (0,01-1,5 µM) wurde bei einer Flussrate von 25 µL/min gemessen. Die Regeneration fand mit 3 M MgCl₂ bei einer Flussrate von 100 µL/min statt. Als Referenz wurde eine Flusszelle mit EDC/NHS aktiviert und dann mit 1 M Ethanolamin geblockt. Das Fitting der Daten wurden mit dem Programm BIAevaluation und soweit nicht anders aufgeführt, mit dem mathematischen Algorithmus 1:1 Langmuir Bindung mit driftender Basislinie und lokal bestimmten R_{\max} durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 AFFINITÄTSREIFUNG IM scFv-FORMAT ZUR ENTWICKLUNG VON IgGs

Um die Eignung des scFv-Formats für die Affinitätsreifung von IgGs zu überprüfen, wurden im scFv-Format bereits affinitätsgereifte Antikörper in IgG-(ähnliche)-Formate überführt und hinsichtlich ihrer Antigenbindung verglichen. Hierzu wurde das MUC1-spezifische Antikörperfragment IIB6 scFv (Tolékis, 2004) und dessen mittels *ErrorCytomics FC 500-prone*-PCR und Phagen-Display basierter Selektion affinitätsgereiften Varianten (Thie et al., 2011) verwendet. Der Vergleich dieser Antikörper in den Formaten IgG und scFv-Fc wird hier aufgeführt.

4.1.1 Klonierung und Produktion unterschiedlicher α -MUC1-Antikörperformate

Für die Produktion von humanen IgGs wurden die Gene der variablen Domänen V_H und V_L der Antikörper IIB6, HT186-B7, HT186-D11 und HT186-G2 in die eukaryotischen Expressionsvektoren pCSH1c (schwere Kette) und pCSL3l (leichte Kette) kloniert. Außerdem wurden die Antikörpergene im scFv-Format und für den HT186-D11 zusätzlich im scFab Δ C-Format in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5-hlgG1-Fc-XP integriert, um scFv-Fc-Fusionen bzw. scIgGs zu produzieren.

Die Vektoren wurden in eukaryotische HEK293-6E-Zellen (Durocher et al., 2002) mittels PEI-Transfektion eingebracht und die entsprechenden Antikörper in einer Suspensionskultur produziert. Die in den Kulturüberständen befindlichen Antikörper wurden anschließend mittels Protein A Affinitätschromatographie gereinigt und die Konzentration der Proteine wurde photometrisch bestimmt. Die Ausbeute der Antikörper war abhängig vom Format zwischen 157-227 mg/L für scFv-Fc-Fusionsantikörper, 106 mg/mL für den HT186-D11 scIgG und zwischen 2-60 mg/L für IgGs (Tabelle A.1).

Durch die SDS-PAGE der gereinigten Antikörper ließen sich schwere (~50 kDa) und leichte (~25 kDa) Kette der IgGs detektieren (Abbildung 4.1). Die Proteinbande der

4 Ergebnisse

isolierten scFv-Fc-Fusionen befand sich mit ~60 kDa etwas höher als die schwere Kette der IgGs. Der HT186-D11 scIgG hatte eine apparente Molekülmasse von ~100 kDa.

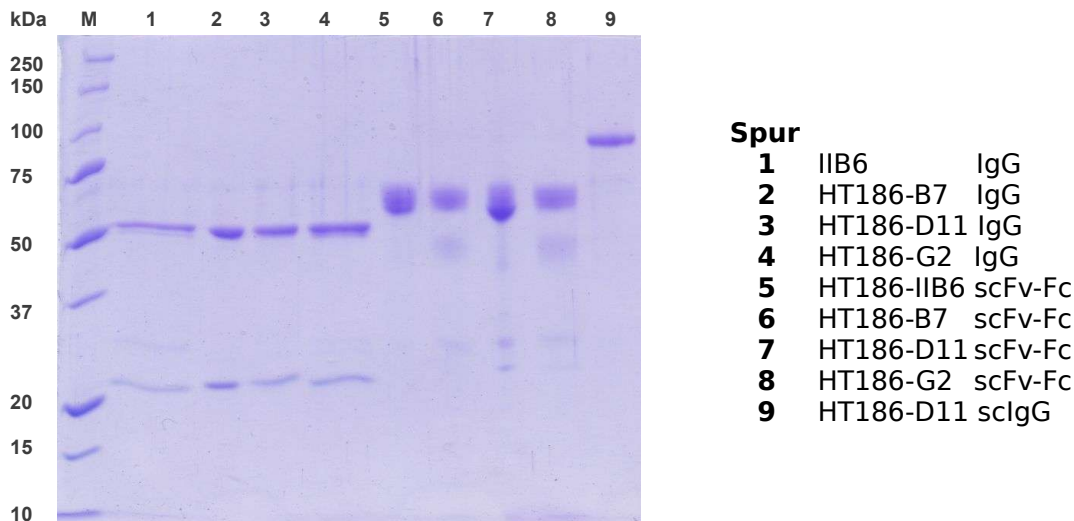


Abbildung 4.1: Produktion und Reinigung von MUC1-spezifischen Antikörpern

1 µg der jeweiligen Antikörper wurde in einem 12 %igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Coomassie gefärbt. M, Proteingrößenstandard *Precision Plus Protein Unstained Standard*

4.1.2 Bindungsstudien unterschiedlicher α -MUC1-Antikörperformate

Zur Überprüfung der spezifischen Bindung der Antikörper an MUC1-Peptid wurde diese mit Hilfe eines Titrations-ELISA verglichen. Die affinitätsgereiften Antikörper im scFv-Fc-Format banden bei gleicher Konzentration stärker an MUC1-Peptid als der Ausgangsantikörper IIB6 scFv-Fc, wobei die scFv-Fc-Fusionsantikörper HT186-B7 und -D11 die stärkste Bindung aufwiesen (Abbildung 4.2).

Dies traf wiederum bei den gleichen Antikörpern im IgG-Format nicht zu. Hier wies nicht der Ausgangsklon IIB6 IgG, sondern der im scFv-Format affinitätsgereifte HT186-G2 die geringste Bindungsstärke zum MUC1-Peptid auf. Der affinitätsgereifte Antikörper HT186-B7 IgG band bei Konzentrationen unter 10 nM ähnliche stark wie der Ausgangsantikörper IIB6 IgG. Nur der HT186-D11 IgG war dem IIB6 IgG deutlich in der Antigenbindungsstärke überlegen.

Vergleicht man die Bindungsstärken der Antikörper beim Formatwechsel von scFv-Fc zum IgG-Format, so kam es beim IIB6 zu einer deutlichen Zunahme, beim HT186-B7 zu einer Abnahme der Bindungsstärke zum MUC1-Peptid. Bei den Antikörpern HT186-D11 und -G2 hatte der Formatwechsel nur einen geringen Einfluss auf die MUC1-Peptid-Bindungsstärke. Die Bindungsstärke des HT186-D11 war in den Formaten scFv-Fc und sclgG nahezu identisch.

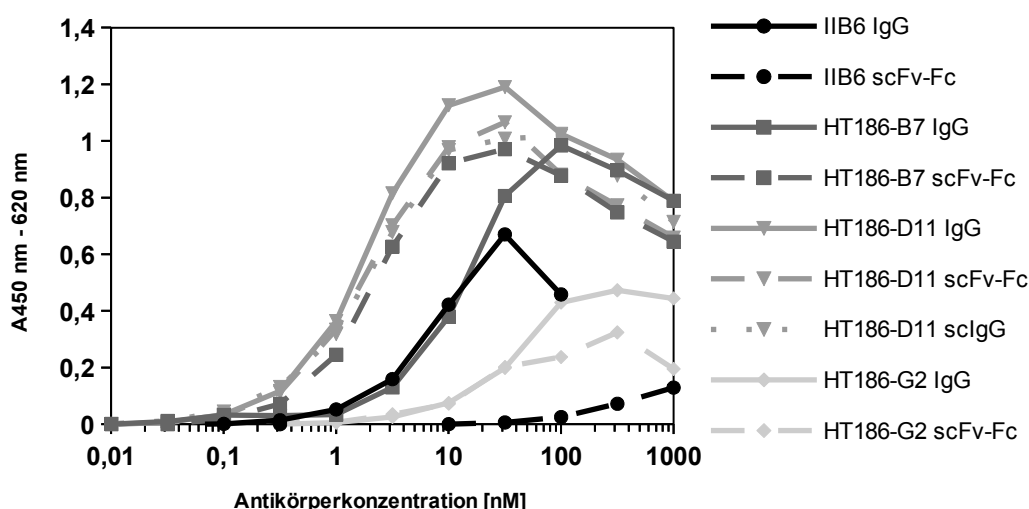


Abbildung 4.2: Nachweis spezifischer MUC1-Peptid-Bindung

Antigen-ELISA mit einer Verdünnungsreihe gereinigter, MUC1-spezifischer Antikörper in den Formaten IgG, scFv-Fc und sclgG.

4.1.3 Multimerbildung unterschiedlicher α -MUC1-Antikörperformate

Um die Eigenschaft der verschiedenen MUC1-spezifischen Antikörperformate zur Ausbildung von Aggregaten zu untersuchen, wurden diese mittels Größenausschlusschromatographie (engl.: *size exclusion chromatography*, SEC) analysiert. Diese Methode ermöglicht die Trennung von Proteinen nach Größe und Konformation. Liegen Antikörper in Aggregaten vor, die mehrere Bindestellen besitzen, kann dies zu Aviditätseffekten und dadurch zu einer höheren apparenten Affinität führen.

Für die Zuordnung des Retentionsvolumen zu einer molekularen Masse, wurde eine Reihe von Proteinen mit bekannter molekularen Masse mittels SEC analysiert (Daten nicht gezeigt).

4 Ergebnisse

Für die untersuchten IgGs wurden mit Ausnahme des HT186-D11 nur Monomere nachgewiesen (Abbildung 4.3). Das Chromatogramm des HT186-D11 IgGs und scIgGs, sowie aller scFv-Fc-Fusionen hatte zusätzlich mindestens einen weiteren, weniger großen Peak, der auf Multimere zurückzuführen war. Beim IIB6 scFv-Fc wurden Dimere (22 %) und Trimere (17 %) identifiziert. Auch der HT186-D11 IgG zeigte Dimer- (9 %) und Trimerbildung (4 %). Die übrigen Antikörper wiesen folgende Anteile an Dimeren auf: HT186-B7 scFv-Fc 9 %, HT186-D11 scFv-Fc 19 %, HT186-D11 scIgG 10 % und HT186-G2 scFv-Fc 18 %. Die Ausbildung von Dimeren oder Trimeren war bei den untersuchten Antikörpern demnach formatabhängig und nahm in der Reihenfolge IgG, scIgG, scFv-Fc zu.

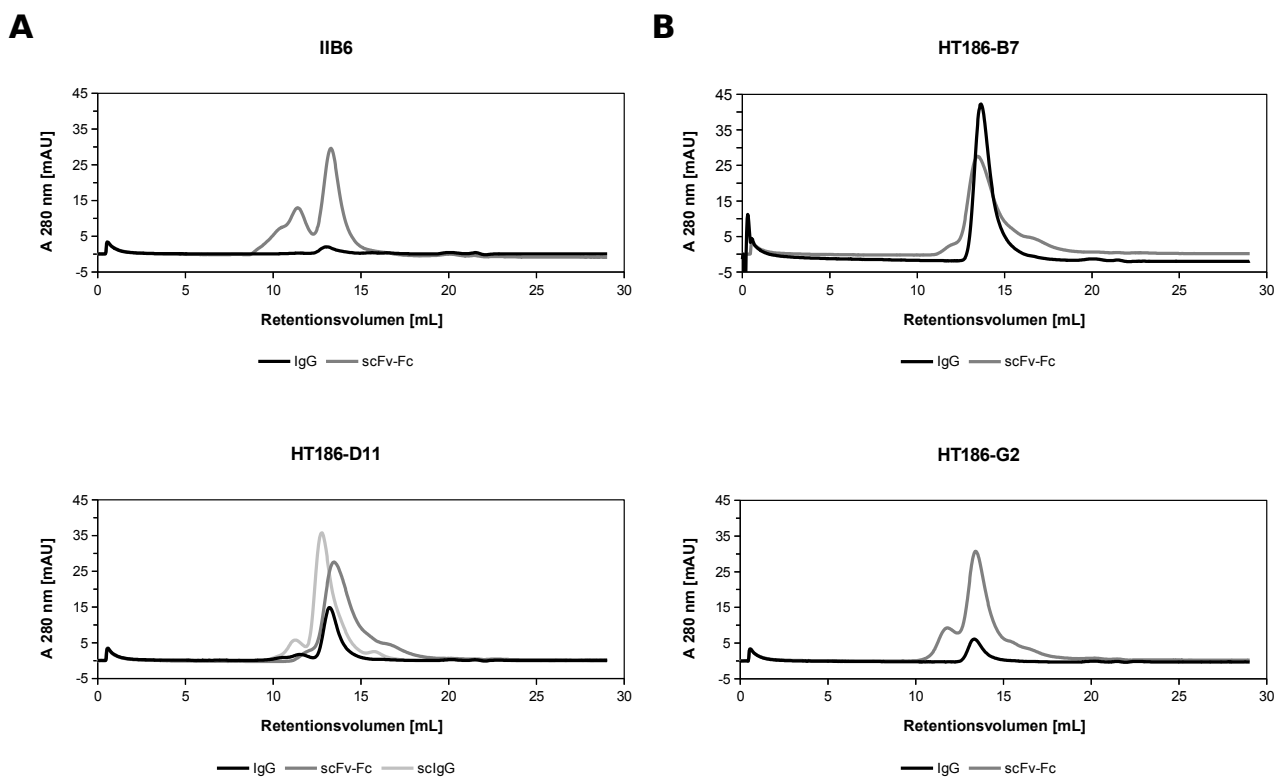


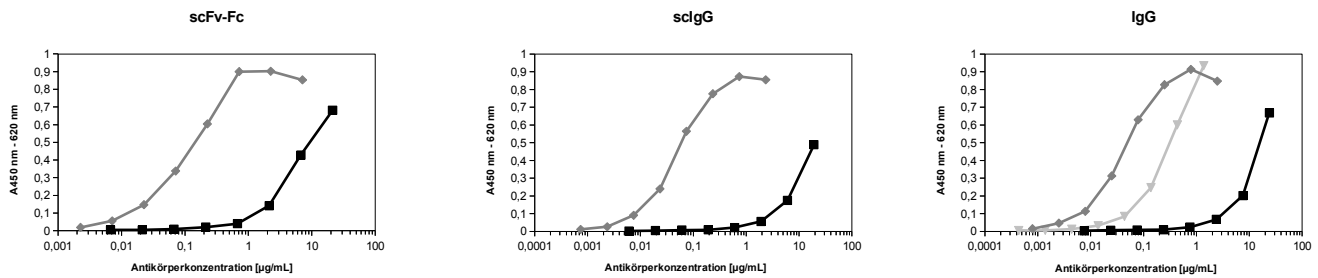
Abbildung 4.3: Multimerbildung MUC1-spezifischer Antikörper

Analytische SEC zur Bestimmung des Aggregationsverhalten der Antikörper IIB6 (A), HT186-B7 (B), -D11 (C) und -G2 (D) in IgG-, scFv-Fc- und scIgG-Format (nur HT186-D11). Es wurden wenn möglich 100 µg bzw. maximal 200 µL der Antikörper aufgetragen. Dargestellt ist die Absorption bei $\lambda=280$ nm in Bezug zum Retentionsvolumen [mL].

Um den Einfluss der Dimer- bzw. Trimerbildung auf die Bindung der Antikörper an MUC1-Peptid zu untersuchen, wurde mit den einzelnen Fraktionen ein Titrations-ELISA durchgeführt. Durch die Bildung von Dimeren kam es bei den untersuchten Antikörpern zu einer stärkeren Antigenbindung durch eine Zunahme der apparenten

Affinitäten (Abbildung 4.4). Durch die Trimerisierung wurde diese für den IIB6 scFv-Fc im Vergleich zu der Dimerfraktion nicht weiter erhöht und für den HT186-D11 IgG war diese im Vergleich zur Dimerfraktion erniedrigt, aber im Vergleich zur Monomerfraktion erhöht.

A: HT186-D11 in verschiedenen Formaten



B: scFv-Fc-Fusionsantikörper

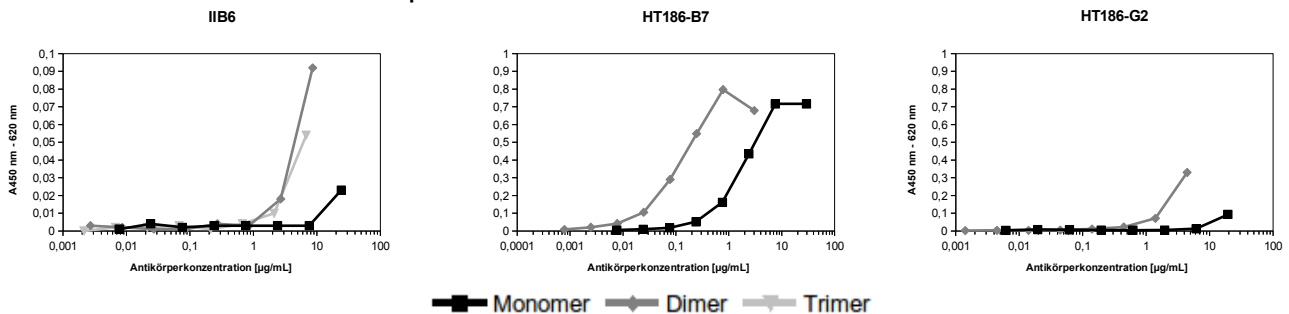


Abbildung 4.4: MUC1-Peptid-Bindung von Antikörpern unterschiedlicher Aggregationsstadien

Nach einer präparativen SEC mit HT186-D11 scFv-Fc, scIgG und IgG (A) bzw. mit scFv-Fc IIB6, HT186-B7 und HT186-G2 (B) wurde ein Antigen-ELISA von Fraktionen die Monomere, Dimere oder Trimere enthielten durchgeführt. Als Nachweis dient der Antikörper-HRP-Konjugat Ziege- α -Human IgG (Fc-spezifisch).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im scFv-Format affinitätsgereifte Antikörper nicht zwingend eine höhere Affinität im IgG-Format besitzen, als der Ausgangsantikörper im IgG-Format.

4.2 NEUE ANTIKÖRPERFORMATE FÜR DIE AFFINITÄTSREIFUNG MITTELS PHAGEN-DISPLAY ZUR ENTWICKLUNG THERAPEUTISCHER IGGs

Der Vergleich der affinitätsgereiften MUC1-spezifischen scFvs im IgG-Format machte deutlich, dass sich die Affinitätssteigerung von Antikörpern im scFv-Format nicht unbedingt auf IgGs übertragen lässt. Deswegen sollte für zwei CD30-spezifische Antikörper überprüft werden, inwieweit sich andere Formate wie scFab Δ C, Fab und Fab Δ C funktional auf der Oberfläche von Phagen präsentieren lassen, um sie für die Konstruktion von Mutationsbibliotheken zwecks Affinitätsreifung nutzen zu können. Affinitätsgereifte Kandidaten sollten dann im IgG-Format miteinander verglichen werden, um den Einfluss des Antikörperformats auf die Affinitätsreifung von IgGs zu untersuchen. Die beiden verwendeten Antikörper SH313-B5 und -F9 sind rekombinante Antikörper, die aus den humanen naïven scFv-Genbibliotheken HAL4 und HAL7 mit Hilfe der Antikörperphagen-Display-Technologie selektiert wurden (Wezler et al., 2012). Hierbei wurde die extrazelluläre Domäne von CD30 genutzt, um spezifische scFv-Phagen aus den Genbibliotheken anzureichern.

4.2.1 Konvertierung von α -CD30 scFv-Phagen in scFab Δ C-, Fab- und Fab Δ C-Phagen

Die CD30-spezifischen Antikörper SH313-B5 und -F9 lagen bereits als scFv- und scFab Δ C-pIII-Fusionskonstrukt in den Phagemiden pHAL14 und pHAL21 vor und wurden als Fab- sowie Fab Δ C-pIII-Fusionskonstrukt kloniert. Für das Fab-Format wurde die leichte Kette und die V_H der schweren Kette in den Phagen-Display-Vektor pHAL13 (Fab) integriert. Für das Fab Δ C-pIII-Fusionskonstrukt wurde eine modifizierte leichte Kette und ein modifiziertes Fd-Fragment, bei denen die für die Aminosäure Cystein kodierenden C-terminalen Nukleotide deletiert wurden, in pHAL29 kloniert.

Antikörperphagen im scFv-, scFab Δ C-, Fab und Fab Δ C-Format wurden in *E. coli XL1-blue-MRF'* unter Verwendung des Helferphagen Hyperphage mit einem Titer von 0,6 – 1,2x10¹⁴ cfu/mL produziert (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Titer CD30-spezifischen Antikörperphagen

Format	Titer [cfu/mL]	
	SH313-B5	SH313-F9
scFv	$1,2 \times 10^{14}$	$9,6 \times 10^{13}$
scFab Δ C	$7,2 \times 10^{13}$	$6,0 \times 10^{13}$
Fab	$5,8 \times 10^{13}$	$6,1 \times 10^{13}$
Fab Δ C	$1,1 \times 10^{14}$	$1,2 \times 10^{14}$

Definierte Mengen der Phagen wurden im ELISA auf ihre CD30-Spezifität, sowie im Western-Blot mit anschließender Immunfärbung untersucht. Die Bindung der Antikörperphagen an das Antigen CD30 war für scFv-Phagen sowohl beim SH313-B5 sowie beim SH313-F9 am stärksten, scFab Δ C- und Fab Δ C-Phagen banden etwa gleich stark und Fab-Phagen am wenigsten stark, wobei die Antigenbindung des SH313-F9 Fab-Phagen erst bei vergleichsweise hohen Phagentitern über 10^{10} /mL im ELISA nachweisbar war (Abbildung 4.5 A, C). Durch die Immunfärbung konnte neben der pIII-Wildtyp-Bande eine Proteinbande für die pIII-Antikörper-Fusionen identifiziert werden (Abbildung 4.5 B, D). Diese Fusionsbande war bei den scFv-Phagen gegenüber den übrigen Antikörperphagen stets stärker ausgeprägt.

Beide CD30-spezifischen Antikörper konnten also in den vier untersuchten Antikörperformaten funktionell auf der Phagenoberfläche präsentiert werden, wobei Fab-Phagen, insbesondere SH313-F9 Fab-Phagen, eine vergleichsweise geringe Bindung an CD30 aufwiesen.

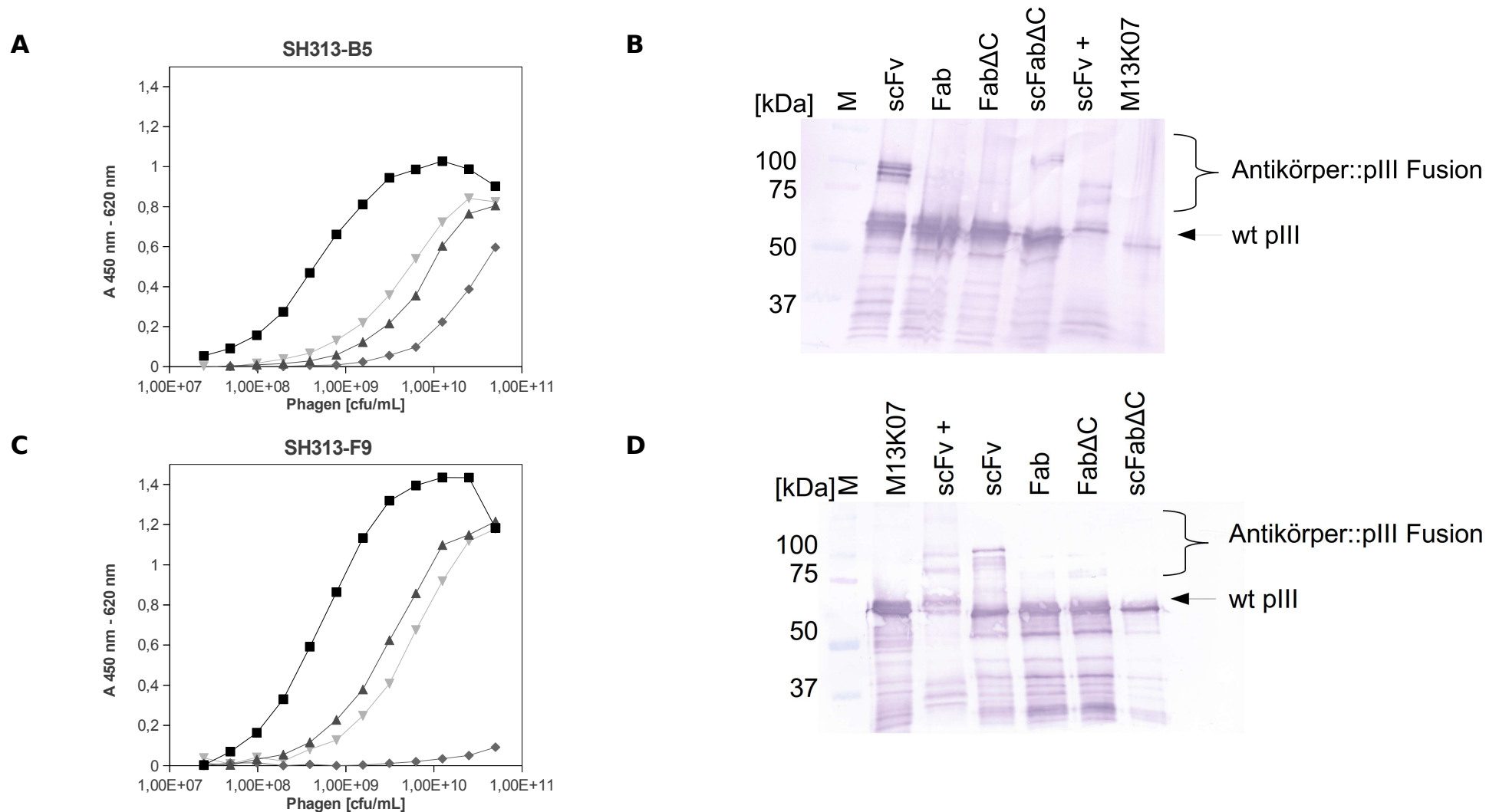


Abbildung 4.5: Nachweis von Antikörper-pIII-Fusionsprotein auf Antikörperphagen

(A, C) Antigen-ELISA einer Verdünnungsreihe der SH313-B5- (A) bzw. SH313-F9- (C) Antikörperphagen.

(B, D) Auf einem 10 %igen SDS-Gel wurden 1×10^{11} SH313-B5- (B) und SH313-F9-Phagen (D) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Mittels Immunfärbung wurden das Phagenprotein pIII nachgewiesen. „scFv +“: positiv Kontrolle, verpackte scFv Bibliothek SH498

4.3 AFFINITÄTSREIFUNG UNTERSCHIEDLICHER α -CD30- ANTIKÖRPERFORMATE

Da zuvor gezeigt wurde, dass neben dem scFv-Format die Formate scFab Δ C, Fab, sowie Fab Δ C grundsätzlich eine funktionelle Präsentation der CD30-spezifischen Antikörper SH313-B5 und -F9 auf Phagen erlaubten, konnten diese Formate nun für die Affinitätsreifung der Antikörper genutzt werden. Die SH313-F9 Fab-Phagen banden ihr Antigen vergleichsweise schwach, aber möglicherweise führen die bei der Affinitätsreifung eingefügten Mutationen zu einer Steigerung der Antigenbindung. Eine Übersicht über die Strategie zur Affinitätsreifung zeigt Abbildung 4.6. Die scFv-Gene wurden mittels *Error-prone*-PCR genetisch zufällig modifiziert und anschließend in die Phagemide pHAL14 (scFv) (Pelat et al., 2007b), pHAL21 (scFab Δ C), pHAL26 (Fab) und pHAL34 (Fab Δ C) (Abbildung 4.7) kloniert. Die beiden letztgenannten Phagen-Display-Vektoren wurden innerhalb dieser Arbeit konstruiert. Die durch Phagen-Display basierter Selektion isolierten affinitätsgereiften Kandidaten wurden anschließend in die bivalenten Formate IgG, scFv-Fc oder sclgG konvertiert und verglichen.

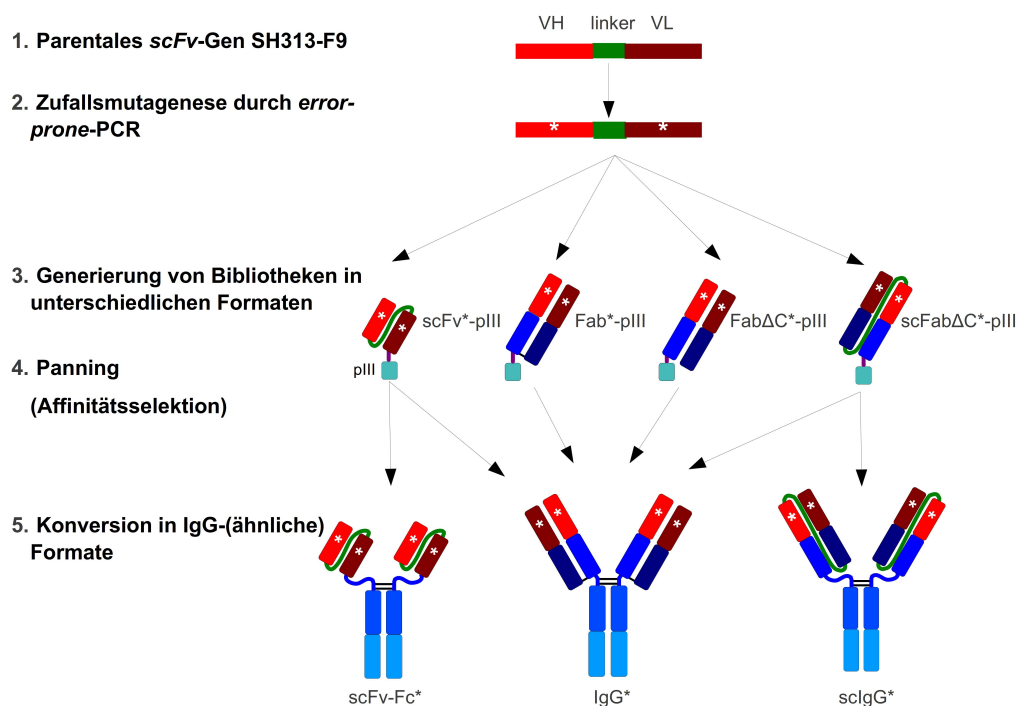


Abbildung 4.6: Schema der verwendete Strategie zur Affinitätsreifung von IgGs

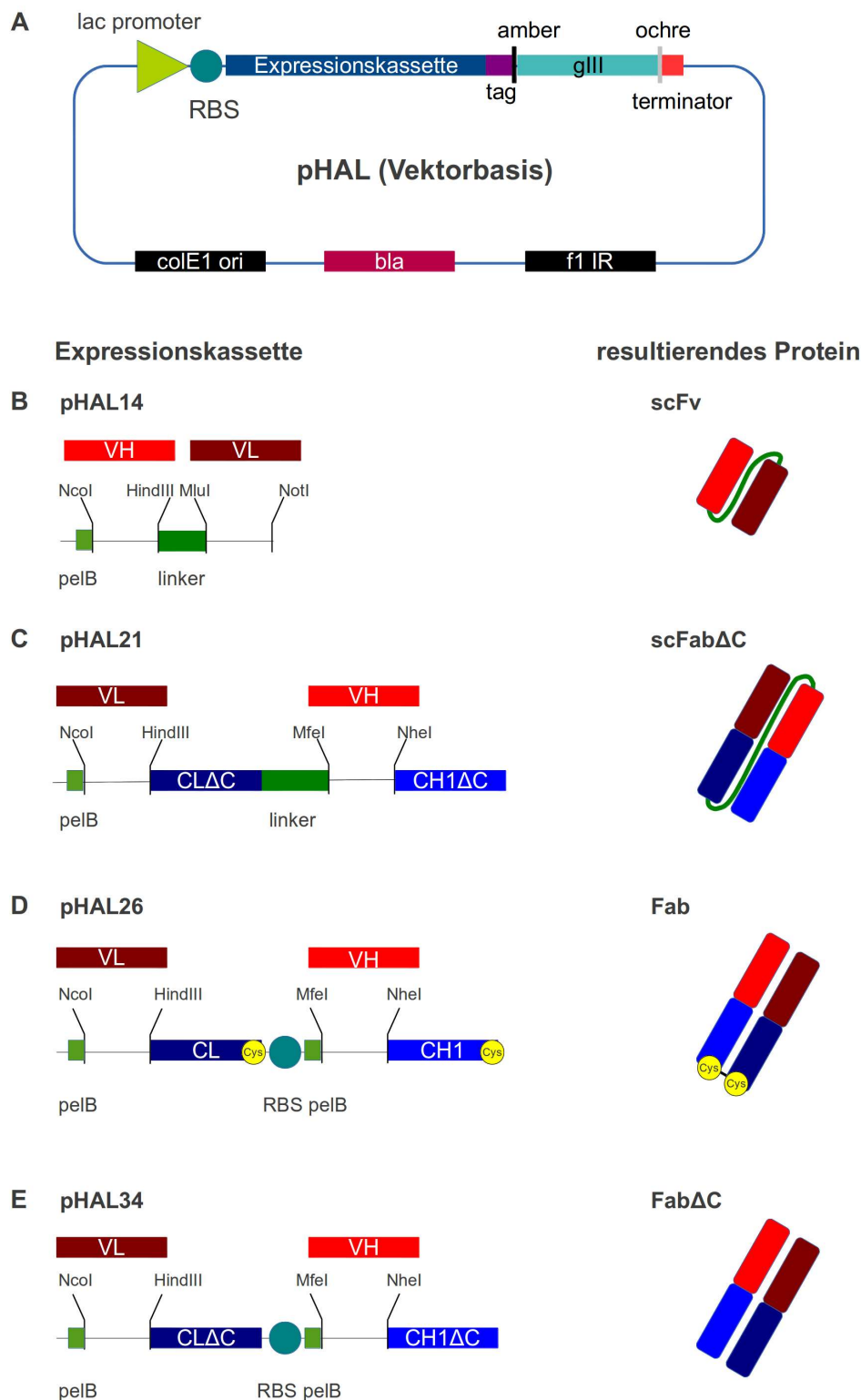


Abbildung 4.7: Übersicht über verwendete Vektoren und Antikörperfragmente

lac promoter: induzierbarer lacZ-Promotor; RBS, Ribosomen-Bindungsstelle; pelB, Gen des Signalpeptids; VH, Gen der variablen Domäne der schweren Kette; VL, Gen der variablen Domäne der leichten Kette; His- und Myc-Tag für Reinigung und Detektion der Antikörperfragmente; amber, Stopp-Codon UAG; ochre, Stopp-Codon UAA; gIII, Gen des Phagen-Hüllproteins pIII; colE1, Replikationsursprung für *E. coli*; f1 IR, Phagen-Verpackungssignal; bla, β -Lactamase-Gen (Selektionsmarker).

4.3.1 Konstruktion neuer Phagemide für Antikörpergenbibliotheken

Die Phagemide pHAL26 und pHAL34 wurden für die Erstellung von Antikörpergenbibliotheken im Fab- bzw. Fab Δ C-Format benötigt (Abbildung 4.7). Beide Vektoren basieren auf dem Vektor pHAL13, welcher die bicistronische Expression von Fab bzw. Fab-Phagen ermöglicht. Als konstante Antikörperdomäne ist in pHAL13 CH1 enthalten, jedoch nicht CL. Um pHAL26 zu erhalten wurde die konstante Domäne der leichten Kette C $_{\lambda}$ in pHAL13 integriert. Für pHAL34 wurde die CH1 ohne die Nukleotide für das C-terminale Cystein (C $_{H1\Delta C}$) gegen CH1 im Vektor pHAL13 ausgetauscht. Anschließend wurde noch die konstante Domäne der leichten Kette vom Typ λ ohne die Nukleotide für das C-terminale Cystein (C $_{\lambda\Delta C}$) kloniert.

4.3.2 Herstellung mutagenisierter Antikörpergenbibliotheken

Um Zufallsmutationen in die scFv-Gene des SH313-B5 und -F9 einzufügen, wurden insgesamt drei konsequente *Error-prone*-PCRs durchgeführt. Die *Error-prone*-PCR ermöglicht das zufällige Einfügen von Punktmutationen durch den Einsatz einer DNA-Polymerase, die keine *Proof-reading*-Funktion besitzt.

Zunächst wurden die PCR-Parameter Annealing-Temperatur und DNA-Matrizenmenge variiert, wobei sich eine Temperatur von 65°C und 0,05 ng DNA als Matrize im Bezug auf die Amplifikation eines möglichst geringen Anteil von Nebenprodukten in der PCR als optimal erwiesen (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde die Amplifikation von Nebenprodukten der PCR durch den Austausch des Primerpaars in der zweiten und dritten PCR-Runde reduziert (Daten nicht gezeigt). Die Amplifikation der scFvs nach der dritten *Error-prone*-PCR ist in Abbildung 4.8 gezeigt.

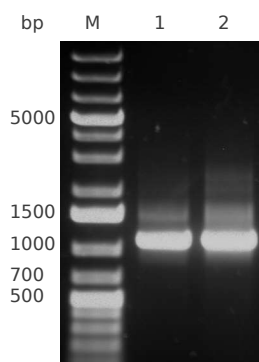


Abbildung 4.8: Error-prone-PCR von scFv-Genen mittels Mutazyme II

Auf einem 1 %igen Agarosegel wurden 4 µL der PCR-Reaktion nach der dritten Mutationsrunde der scFv-Gene des SH313-B5 (Spur 1, 1051 bp) bzw. des SH313-F9 (Spur 2, 1057 bp) aufgetragen.

Damit für die Klonierung der Antikörpergenbibliotheken genug DNA-Material zur Verfügung stand, wurden die mutierten scFv-Gene durch eine DNA-Polymerase mit *Proof-reading*-Funktion amplifiziert. Danach erfolgte die Klonierung der mutierten scFv-Gene in den Vektor pHAL14. Der inaktivierte Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation in elektrokompente *E. coli* XL1blue-MRF' eingebracht. So wurden Bibliotheken von $1,6 \times 10^6$ (SH313-B5) bzw. $1,0 \times 10^7$ (SH313-F9) cfu erhalten. Eine KPCR von jeweils 16 Einzelklonen ergab, dass der Anteil von vollständigen scFv-Genen in 56 % (SH313-B5) bzw. 73 % (SH313-F9) betrug. Jeweils acht von denen laut KPCR vollständigen scFv-Genen wurden sequenziert. Durchschnittlich waren zwölf Nukleotide (SH313-B5) bzw. 14 Nukleotide (SH313-F9) mutiert. Dies führte zu durchschnittlich acht Aminosäuresubstitutionen (Tabelle 4.2). Jeweils zwei Sequenzen wiesen ein Stopp-Codon auf.

Tabelle 4.2: Anzahl von Punktmutationen und AS-Substitutionen scFv-Antikörpergenbibliotheken

	SH313-B5	SH313-F9
Punktmutationen/scFv (Ø)	8-16 (12)	9-22 (14)
AS-Austausche/scFv (Ø)	7-15 (8)	7-11 (8)

Die scFv-Bibliotheken wurden in die Formate scFabΔC (pHAL21), Fab (pHAL26) und FabΔC (pHAL34) reformatiert, indem die Gene für die variablen Domänen in die entsprechenden Vektoren integriert wurden. Durch die Transformation von *E. coli* XL1blue-MRF' mittels Elektroporation wurden Bibliotheken mit einer theoretischen Komplexität von $1,9-5,7 \times 10^7$ Klonen erhalten (Tabelle 4.3). KPCRs von jeweils mindestens acht Klonen ergab einen Anteil von 75 % -100 % vollständiger

Antikörpergen-Inserts.

Tabelle 4.3: Eigenschaften der mutagenisierten Antikörpergenbibliotheken

Antikörperklon	Format	Theoretische Komplexität	Anteil vollständiger Antikörpergene [%]	Titer [cfu/mL]	
				M13K07	Hyperphage
SH313-B5	scFv	$1,6 \times 10^6$	56	$8,6 \times 10^{13}$	$1,1 \times 10^{12}$
SH313-B5	scFab Δ C	$3,7 \times 10^7$	100	$6,0 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{11}$
SH313-B5	Fab	$3,1 \times 10^7$	100	$2,0 \times 10^{12}$	$1,4 \times 10^{11}$
SH313-B5	Fab Δ C	$4,0 \times 10^7$	88	$6,0 \times 10^{12}$	$3,6 \times 10^{11}$
SH313-F9	scFv	$1,0 \times 10^7$	73	$4,6 \times 10^{13}$	$1,0 \times 10^{12}$
SH313-F9	scFab Δ C	$5,7 \times 10^7$	100	$4,0 \times 10^{12}$	$3,2 \times 10^{11}$
SH313-F9	Fab	$1,9 \times 10^7$	75	$4,0 \times 10^{12}$	$2,4 \times 10^{11}$
SH313-F9	Fab Δ C	$2,1 \times 10^7$	100	$1,7 \times 10^{13}$	$2,0 \times 10^{11}$

Die Antikörpergenbibliotheken wurden mit Hilfe des Helferphagens M13K07 oder Hyperphage verpackt und der Titer bestimmt (Tabelle 4.3). Im immungefärbten Western-Blot sind bei den mit Hyperphage verpackten Bibliotheken neben der Wildtyp-pIII-Proteinbande weitere Antikörper-pIII-Fusionsbanden zu sehen (Abbildung 4.9). Die Verwendung des M13K07 führte nicht zu sichtbaren Antikörper-pIII-Fusionsbanden im pIII-immungefärbten Western-Blot (Daten nicht gezeigt).

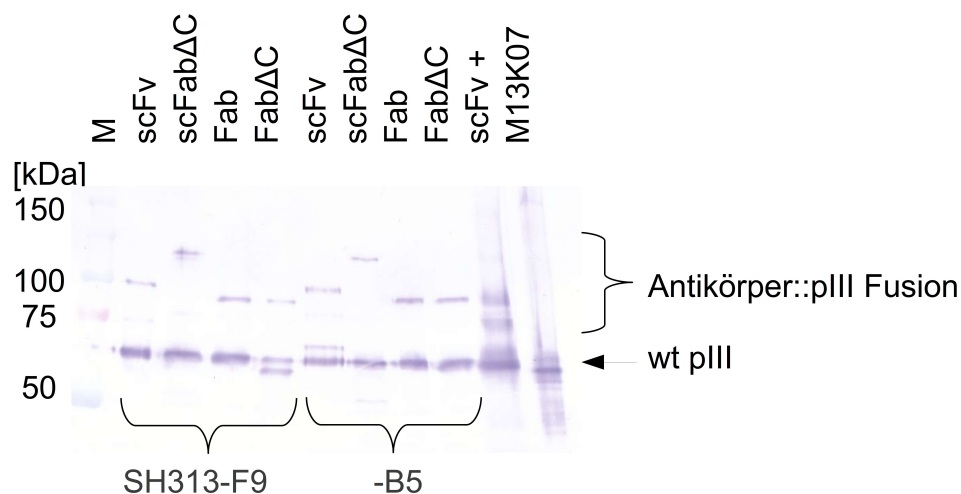


Abbildung 4.9: Nachweis von Antikörper-pIII-Fusionsprotein

Auf einem 10 %igen SDS-Gel wurden 10^9 Phagen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen und das Phagenprotein pIII mittels Immunfärbung nachgewiesen. „scFv +“: positiv Kontrolle, verpackte scFv Bibliothek SH498

4.3.3 Selektion affinitätsgesteigerter Antikörper

Um affinitätsgesteigerte Antikörper aus den erzeugten Antikörpergenbibliotheken zu selektieren, wurden Pannings mit Competition durch lösliches Antigen genutzt, um eine Assoziation von bereits dissoziierten Antikörperphagen an immobilisiertes CD30 zu erschweren. Die vom Antigen mittels Trypsin eluierten Phagen wurden für eine Reinfektion von *E. coli* XL1blue-MRF⁺ genutzt. Mit Einzelklonen wurden Antikörperfragmente in MTP produziert, diese wurden im Antigen-ELISA mit den nicht mutierten SH313-F9 bzw. SH313-B5 verglichen. Exemplarisch ist das Screening von mutierten SH313-F9 scFvs, scFabΔCs und FabΔCs dargestellt (Abbildung 4.10).

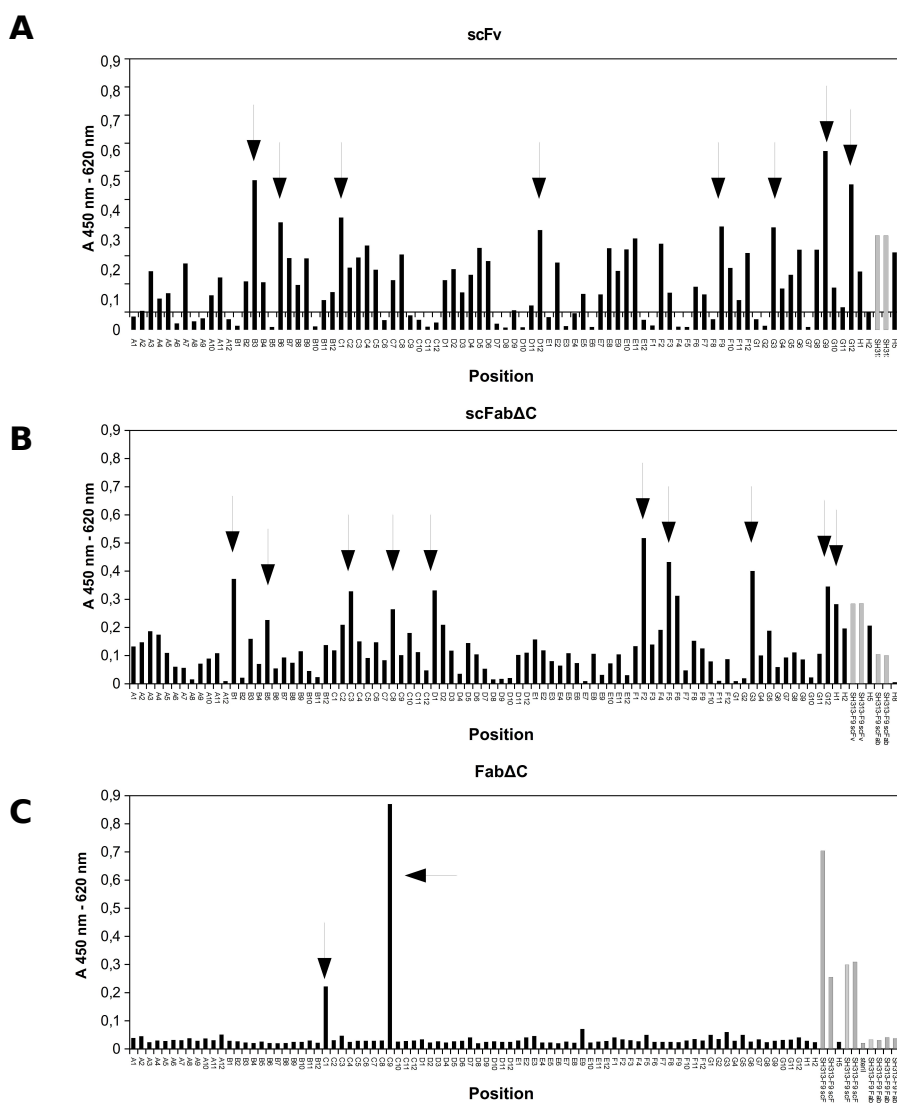


Abbildung 4.10: Identifizierung von CD30-spezifischen SH313-F9 Varianten
ELISA mit Überständen aus der MTP-Produktion von mutierten SH313-F9 scFvs (A), scFabΔCs (B), FabΔCs (C). Zur weiteren Analyse ausgewählte Klone sind mit schwarzen Pfeilen markiert.

Im Screening-ELISA von affinitätsgereiften Antikörper im Fab- bzw. Fab Δ C-Format konnten aufgrund der niedrigen Signal zu Rausch-Verhältnissen im Vergleich zu den Antikörperformaten scFv und scFab Δ C wenige Antikörperklone identifiziert werden. So war auch bei den nicht mutierten Klonen SH313-F9 und SH313-B5 Fab bzw. Fab Δ C keine CD30-Bindung im ELISA nachweisbar. Deswegen wurde die Produktion von Fabs und Fab Δ Cs bei 25°C hinsichtlich der Produktionsdauer optimiert. Außerdem wurde der Einfluss einer Induktion der Expression mit und ohne IPTG, sowie zwei Medien (LB und 2xYT) untersucht.

Grundsätzlich konnten die ELISA Signale von mutierten Antikörperfragmenten, aber nicht die der Ausgangsklone erhöht werden (Abbildung 4.11). Hier konnte eine Zunahme der ELISA-Signale durch die Verlängerung der Produktionsdauer erzielt werden. Eine Produktion ohne die Induktion mit IPTG führte im Vergleich zur Induktion mit IPTG zu niedrigeren Signalen im ELISA (Daten nicht gezeigt). Während der ELISA der Produktion des MiS203-C9 Fab Δ C in beiden Medien ungefähr gleich hohe Signale ergab, erhielt man im LB-Medium bei einer Produktionsdauer über 28 h die höchsten ELISA Signale für den Klon MiS196-D5 Fab Δ C.

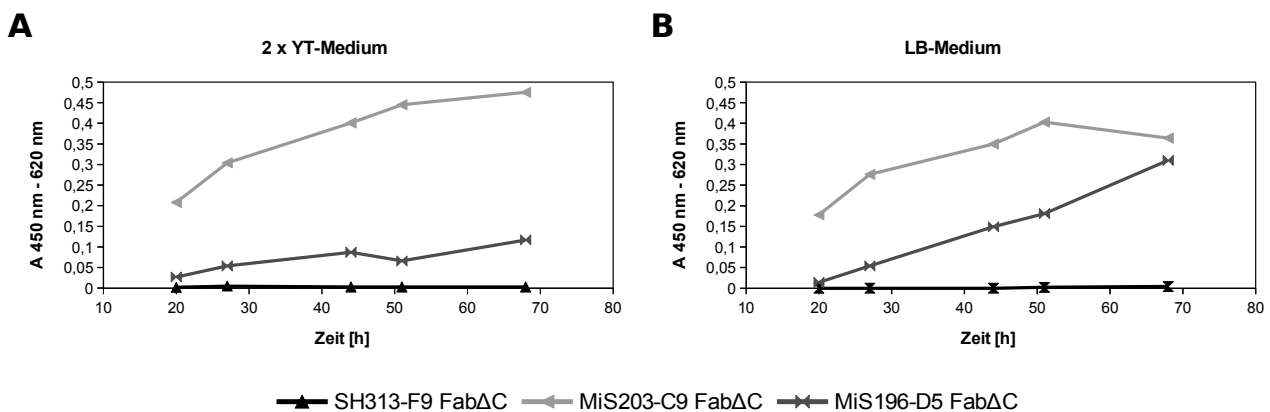


Abbildung 4.11: Zeitabhängige Fab- bzw. Fab Δ C-Produktion

CD30-spezifische Antikörper wurden im MTP-Maßstab bei 25°C in 2xYT- oder LB-Medium produziert. Die Überstände wurden mittels ELISA auf lösliches funktionales Fab Δ C- bzw. Fab-Protein gegen CD30 überprüft. Die Signale der Klone SH313-F9 Fab, SH313-B5 Fab und SH313-B5 Fab Δ C entsprachen den für SH313-F9 Fab Δ C bestimmten Signalen und wurden hier nicht aufgeführt.

4 Ergebnisse

Die erhöhte CD30-Bindung affinitätsgereifter Kandidaten im Screening-ELISA wurde durch einen Antigen-ELISA verifiziert. In Abbildung 4.12 sind der Übersicht halber nur ausgewählte Antikörper gezeigt, deren im ELISA gemessene Absorption höher war als der jeweilige zu Grunde liegende Antikörperklon. Da höhere Signale im ELISA nicht nur auf eine höhere Affinität der Antikörper zu ihrem Antigen, sondern auch auf eine höhere Produktion zurückzuführen sein könnten, wurden die Konzentration der Antikörper zusätzlich mit Hilfe von immungefärbten Western-Blots bestimmt (Daten nicht gezeigt).

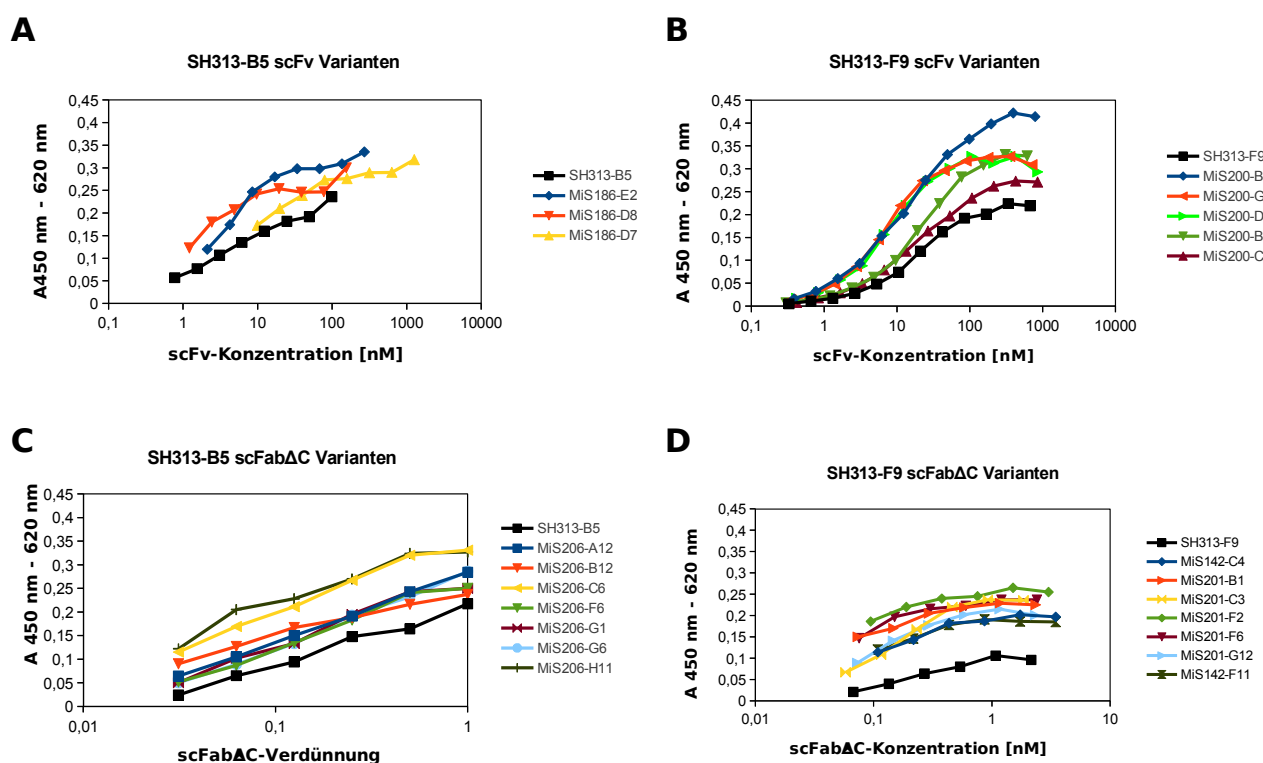


Abbildung 4.12: Vergleich der Antigenbindung von CD30-spezifischen Antikörperfragmenten

Antigen-ELISA einer Verdünnungsreihe der Überstände aus der Produktion von mutierten Antikörperfragmenten (SH313-B5 scFv (A), SH313-F9 scFv (B), SH313-B5 scFabΔC (C), SH313-F9 scFabΔC (D)) in MTP. Die Konzentrationen der Antikörper wurden durch einen immungefärbten Western-Blot bestimmt (außer SH313-B5 scFabΔC-Klone).

Durch eine Sequenzanalyse wurde ermittelt, dass die untersuchten Antikörperklone individuelle Sequenzen enthielten. Die durchschnittliche Anzahl von Mutationen, die zu Aminosäuresubstitutionen führte, lag bei den SH313-B5 Varianten bei 4,2, bei SH313-F9 bei 4,1 je Antikörperklon. Dabei wurden in der V_H durchschnittlich 1,4 (SH313-B5) bzw. 2,4 (SH313-F9) Aminosäuresubstitutionen pro Antikörper gefunden. V_L hatte im

Durchschnitt 2,8 (SH313-B5) bzw. 1,7 (SH313-F9) Aminosäuresubstitutionen je Antikörper.

Die Verteilung der Mutationen, die zu einem Austausch der zu kodierenden Aminosäure (AS) führt, war für beide untersuchte Antikörper nicht gleichmäßig. Es gab sowohl Bereiche, die nicht von AS-Substitutionen betroffen waren, als auch *hot spots*, bei denen es zu besonders vielen AS-Substitutionen kam (Abbildung 4.13-Abbildung 4.15). So enthielten die Bereiche der CDR1 und CDR2 der V_H, sowie CDR2 und FR4 von V_L des SH313-B5 keine AS-Substitutionen. Als *hot spot* trat die dritte AS (unpolar, hydrophob) in CDR1 der V_L auf, die bei 14 von 15 Antikörpern in eine unpolare, neutrale Aminosäure ausgetauscht war.

Ebenso kam es in den Bereichen des FR2 und FR4 von V_H und der CDR2 und FR4 von V_L des Antikörpers SH313-F9 nicht zu AS-Substitutionen. Im Gegensatz dazu gab es einen *hot spot* in der ersten Position von V_H-CDR3, in der es innerhalb der 21 analysierten Antikörperklone in elf Fällen zu einem Austausch einer unpolaren, hydrophoben AS in eine andere unpolare, hydrophobe, größere AS. Außerdem kam es auch zu einem formatabhängigen Austausch von AS. So ist die Position drei (unpolare, hydrophobe AS) in V_L-FR3 in allen im Fab Δ C Format affinitätsgereiften Klonen in dieselbe neutrale, hydrophobe AS substituiert.

Durch die Konstruktionsweise der Antikörpergenbibliotheken waren Mutationen im Polypeptidlinker nur für scFvs möglich. Durchschnittlich waren im Polypeptidlinker der identifizierten Mutanten beider scFvs 1,1 Aminosäuresubstitutionen enthalten (Abbildung 4.13).

Klon	C _H 1-Rest	yol	Parentalklon
Mis186-E2	■-----	-----■-----	SH313-B5
Mis186-D7	-■-----	-----	SH313-B5
Mis186-D8	--■-----	-----	SH313-B5
Mis200-B3	-----	-----■-----	SH313-F9
Mis200-G12	-----	■-----	SH313-F9
Mis200-C1	-----	■-----	SH313-F9
Mis200-B6	-----	■-■-----	SH313-F9
Mis200-D12	-----	-----	SH313-F9

Abbildung 4.13: Vergleich der AS-Sequenzen im Linker selektierte scFvs

Die AS-Sequenzen im Linker von SH313-B5 und -F9 Varianten wurden miteinander verglichen. ■ kennzeichnet eine Mutation.

V _H	Format	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
SH313-B5	scFv	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS186-E2	scFv	-----	-----	-----■-----	-----	-----■-----	-----	-----■-----■-----
MiS186-D7	scFv	-----■-----	-----	-----	-----	-----■-----	-----	-----
MiS186-D8	scFv	-----	-----	-----	-----	-----■-----	-----	-----
MiS206-G1	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS206-F12	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----■-----■-----	-----	-----
MiS206-G5	scFabΔC	-----	-----	-----■-----	-----	-----	-----	-----
MiS138-G9	scFabΔC	-----■-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS206-F6	scFabΔC	-----■-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS206-C6	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----■-----	-----	-----
MiS206-C5	scFabΔC	-----	-----	-----■-----	-----	-----	-----■-----	-----
MiS206-H1	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----■-----	-----
MiS206-A12	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----■-----	-----	-----
MiS206-B12	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----■-----	-----
MiS206-G6	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS374-H6	Fab	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

V _L	Format	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
SH313-B5	scFv	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----
MiS186-E2	scFv	-----■-----	-----	-----	---	-----■-----■-----	-----■-----	-----
MiS186-D7	scFv	-----■-----■-----	-----	-----	---	-----	-----	-----
MiS186-D8	scFv	-----■-----■-----	-----	-----■-----	---	-----■-----	-----	-----
MiS206-G1	scFabΔC	-----■-----■-----	-----	-----	---	-----■-----	-----■-----	-----
MiS206-F12	scFabΔC	-----■-----	-----	-----	---	-----■-----	-----	-----
MiS206-G5	scFabΔC	-----■-----■-----	-----	-----■-----	---	-----■-----	-----	-----
MiS138-G9	scFabΔC	-----■-----	-----	-----■-----	---	-----	-----	-----
MiS206-F6	scFabΔC	-----■-----■-----	-----	-----	---	-----	-----	-----
MiS206-C6	scFabΔC	-----■-----■-----	-----■-----	-----	---	-----	-----	-----
MiS206-C5	scFabΔC	-----■-----■-----	-----	-----	---	-----	-----	-----
MiS206-H1	scFabΔC	-----■-----	-----	-----	---	-----■-----■-----	-----	-----
MiS206-A12	scFabΔC	-----■-----■-----■-----	-----	-----	---	-----	-----	-----
MiS206-B12	scFabΔC	-----■-----	-----	-----	---	-----	-----	-----
MiS206-G6	scFabΔC	-----■-----	-----	-----	---	-----■-----	-----	-----
MiS374-H6	Fab	-----■-----■-----	-----■-----	-----	---	-----■-----	-----	-----

Abbildung 4.14: Vergleich der Aminosäuresequenzen affinitätsgesteigerter SH313-B5 Varianten

Die Aminosäuresequenzen des SH313-B5 und der affinitätsgereiften Kandidaten wurden mittels VBASE2 (<http://www.vbase2.org/>) in FR- und CDR-Bereiche eingeteilt. ■ kennzeichnet eine Mutation.

V _H	Format	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
SH313-F9	scFv	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS200-B3	scFv	-----	-----	-----	■	-----	-----	-----
MiS200-G12	scFv	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS200-C1	scFv	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS200-B6	scFv	-----	-----	-----	■	-----	-----	-----
MiS200-D12	scFv	-----■-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-H1	scFabΔC	-----	-----	-----	■	-----	-----	-----
MiS201-B5	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-C8	scFabΔC	-----	-----	-----	■	-----	-----	-----
MiS201-G12	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-B1	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-G3	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-F5	scFabΔC	-----■-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-D1	scFabΔC	-----	-----■-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-C3	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS179-F5	scFabΔC	-----■-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS179-F6	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS179-F11	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-F2	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS196-D5	FabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS203-C9	FabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS203-C1	FabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
SH313-F9	scFv	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS200-B3	scFv	-----	-----	-----■-----	-----	-----	-----	-----
MiS200-G12	scFv	-----	-----■-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS200-C1	scFv	-----	-----	-----	-----	-----	-----■-----	-----
MiS200-B6	scFv	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS200-D12	scFv	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-H1	scFabΔC	-----■-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-B5	scFabΔC	-----■-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-C8	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-G12	scFabΔC	-----	-----■-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-B1	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-G3	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-F5	scFabΔC	-----■-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-D1	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-C3	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS179-F5	scFabΔC	-----■-----	-----■-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS179-F6	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS179-F11	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS201-F2	scFabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS196-D5	FabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS203-C9	FabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS203-C1	FabΔC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 4.15: Vergleich der Aminosäuresequenzen affinitätsgesteigerter SH313-F9 Varianten

Die Aminosäuresequenzen des SH313-F9 und der affinitätsgereiften Kandidaten wurden mittels VBASE2 (<http://www.vbase2.org/>) in FR- und CDR-Bereiche eingeteilt. ■ kennzeichnet eine Mutation.

4.4 KONVERTIERUNG AFFINITÄTSGESTEIGERTER α -CD30

ANTIKÖRPERFRAGMENTE IN IgG-(ÄHNLICHE) FORMATE

Um zu überprüfen, ob das Antikörperformat, das zur Affinitätsreifung benutzt wird, die Affinität der Antikörper im IgG-Format beeinflusst, wurden affinitätsgesteigerte Antikörperfragmente in das IgG-Format konvertiert und verglichen. Ist für die spätere Anwendung ein IgG notwendig, ist die Affinität des Antikörpers in eben diesem Format ausschlaggebend. Es gibt bisher keine Möglichkeit von den Affinitäten der Antikörperfragmente die Affinitäten der entsprechenden IgGs zu berechnen.

Für die Expression der Antikörpergene im IgG-Format wurden die Gene für V_H bzw. V_L in die Vektoren pCSH1c bzw. pCSL3I kloniert. Zusätzlich wurden der Vektor pCSE2.5-hlgG1-XP benutzt, um die Antikörperfragmente in ihre korrespondierenden bivalenten Formate scFv-Fc oder sclgG zu konvertierten (Tabelle 4.4, Abbildung A.1).

Tabelle 4.4: Auswahl von Antikörperklonen für die Konvertierung

Klon	Format	Zielformat
SH313-F9	scFv	IgG, scFv-Fc
MiS200-B3	scFv	IgG, scFv-Fc
MiS200-G12	scFv	IgG, scFv-Fc
MiS200-D12	scFv	IgG, scFv-Fc
MiS201-C3	scFab Δ C	IgG, sclgG
MiS201-F2	scFab Δ C	IgG, sclgG
MiS201-F6	scFab Δ C	IgG, sclgG
MiS179-F5	scFab Δ C	IgG, sclgG
MiS196-D5	Fab Δ C	IgG
MiS203-C1	Fab Δ C	IgG
MiS203-C9	Fab Δ C	IgG

4.4.1 Klonierung und Produktion der unterschiedlichen α -CD30 Antikörperformate im 10 mL-Maßstab

Die Produktion der, verglichen mit den bisher untersuchten Antikörperfragmenten, komplexeren Formate IgG, scFv-Fc und scIgG wurde in den eukaryotischen HEK293-6E-Zellen durchgeführt. Die Reinigung der Proteine erfolgte mittels Protein A Affinitätschromatographie und die Proteinkonzentration wurde mittels ECL gefärbten Immunoblot (Tabelle A.2) und zusätzlich mittels *human capture* ELISA (Daten nicht gezeigt) bestimmt. Die Ausbeute der Proteine war für scFv-Fc-Fusionsantikörper mit 19,3 – 31,1 mg/L am größten. Für die scIgGs wurden Ausbeuten von 5,3 – 24,9 mg/L und für IgGs 0,1 – 16,0 mg/L erhalten. Die Variation der Ausbeuten der drei unterschiedlichen Antikörperformate war innerhalb der IgGs mit einem Faktor von 160 zwischen der höchsten und niedrigsten Ausbeute am stärksten. Der Faktor zwischen höchster und niedrigster Ausbeute lag für scIgGs bei 4,7 und für scFv-Fc Fusionen bei 1,6.

4.4.2 CD30-Bindungsstudien („Affinitätsranking“)

Um die Antikörper untereinander zu vergleichen, wurden diese zunächst im Antigen-ELISA mit rekombinantem CD30 analysiert. Die Bindung an CD30⁺ Karpas299-Zellen wurde im Durchflusszytometer überprüft. Außerdem wurden kinetische Messungen mittels Oberflächenplasmonresonanz (engl.: *Surface plasmon resonance*, SPR) durchgeführt. Alle drei Methoden dienten einem Vergleich der Antikörper untereinander.

Bindung an rekombinantes CD30

Die aus dem scFv-Format in das scFv-Fc- und IgG-Format konvertierten Antikörperklone (MiS200-B3, -G12, -D12) wurden im Antigen-ELISA mit rekombinantem CD30 untersucht. Vergleicht man die CD30-Bindung des Parentalklons SH313-F9 in den Formaten IgG, scFv-Fc und scIgG mittels ELISA, so nahm die Bindungsstärke in der Reihenfolge IgG, scIgG, scFv-Fc ab (Abbildung 4.16).

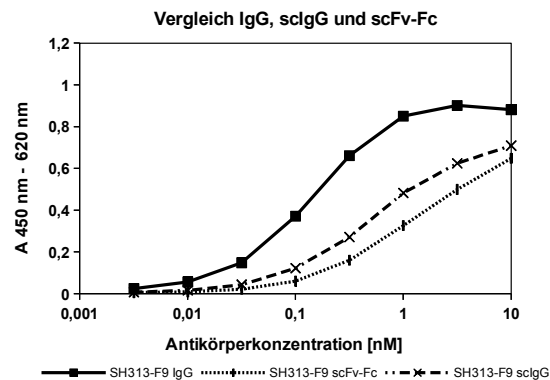


Abbildung 4.16: Vergleich der Bindung des SH313-F9 in den Formaten IgG, scFv-Fc und sclgG

Antigen-ELISA mit SH313-F9 IgG, scFv-Fc und sclgG

Obwohl affinitätsgereifte scFv-Fc Fusionen verglichen mit SH313-F9 scFv-Fc stärker an CD30 banden, wiesen dieselben Antikörperklone im IgG-Format keine stärkere CD30-Bindung als der SH313-F9 IgG (Abbildung 4.17 A, B) auf. Ebenso wurden die aus dem scFab Δ C-Format in das sclgG- und IgG-Format konvertierten Antikörperklone (MiS201-C3, -F2, -F6 und MiS179-F5) mittels ELISA analysiert. Auch hier wurde wiederum im sclgG-Format eine erhöhte Bindung der affinitätsgereiften Antikörper gegenüber dem SH313-F9 sclgG festgestellt, was für dieselben Antikörper im IgG-Format nicht gezeigt werden konnte (Abbildung 4.17 C, D).

IgGs, deren Affinitätsreifung im Fab Δ C-Format statt fand (MiS196-D5, MiS203-C1, -C9), wurden ebenso mittels ELISA mit dem SH313-F9 IgG verglichen. Diese im Fab Δ C-Format affinitätsgereiften Antikörper banden als IgG durchwegs stärker an CD30 als der SH313-F9 IgG (Abbildung 4.17 E).

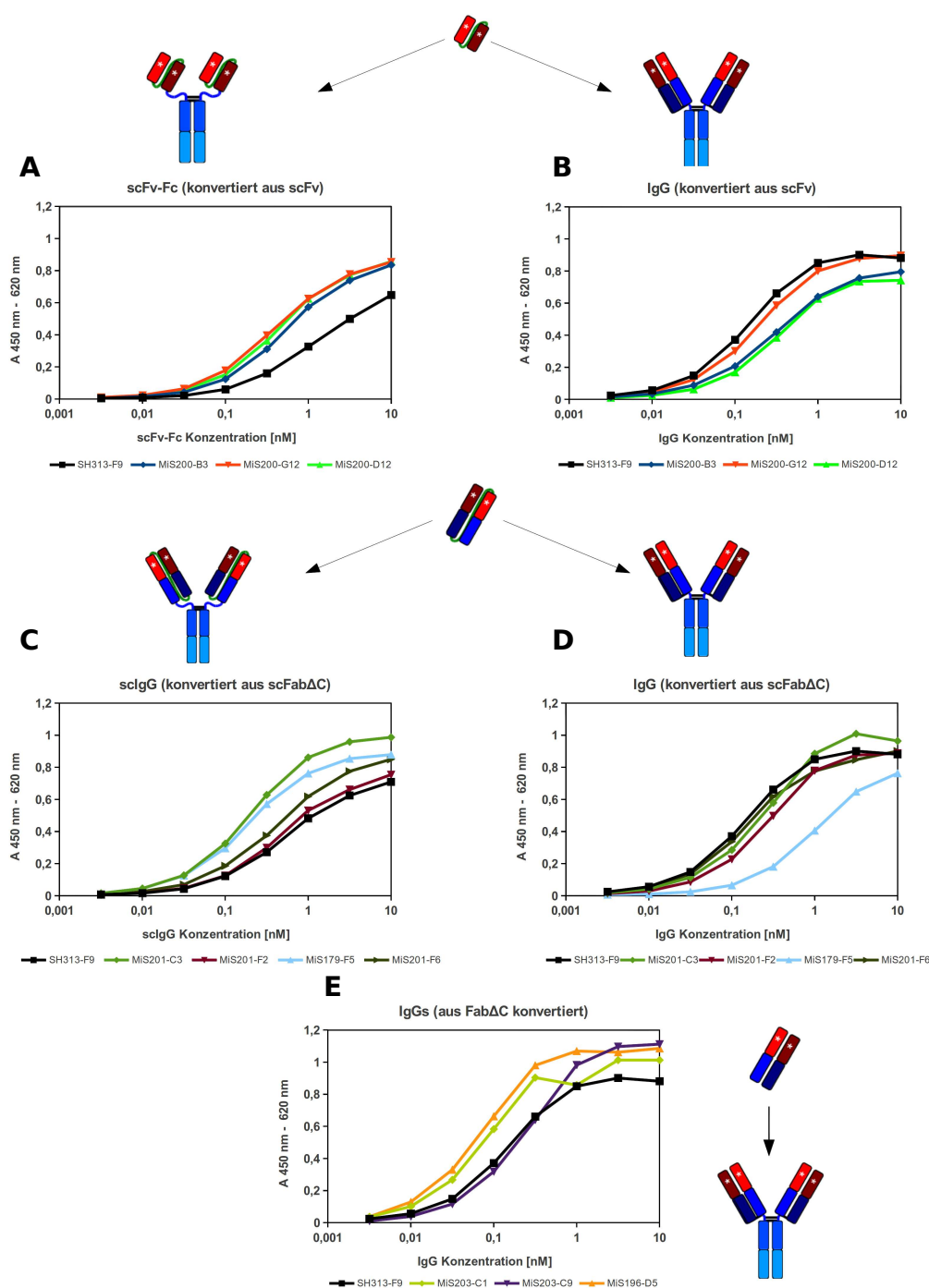


Abbildung 4.17: Bindung von α-CD30 Antikörpern an rekombinantes CD30

Antigen-ELISA einer Verdünnungsreihe der Antikörperformate scFv-Fcs (A) und IgGs (B) (konvertiert aus affinitätsgereiften scFvs), scIgGs (C) und IgGs (D) (konvertiert aus affinitätsgereiften scFabΔC), IgGs (E) (konvertiert aus FabΔC).

4 Ergebnisse

Bindung an CD30⁺ Lymphomzellen

Die aus affinitätsgereiften Antikörperfragmenten konvertierten IgGs wurden nun bezüglich ihrer Bindung an nativen CD30 auf Karpas299-Zellen verglichen. Dazu wurden die an der Oberfläche der Karpas299-Zellen gebundenen Antikörper durch einen Fluoreszenz markierten Sekundärantikörper markiert, der spezifisch an den humanen Fc-Teil der IgGs bindet. Die Fluoreszenz wurde im Durchflusszytometer gemessen. Vergleicht man die affinitätsgereiften IgGs mit dem Parentalklon SH313-F9 IgG, banden zwei der IgGs aus der Affinitätsreifung im Fab Δ C-Format (MiS203-C1 und MiS196-D5) stärker an Karpas299-Zellen, als der SH313-F9 IgG (Abbildung 4.18).

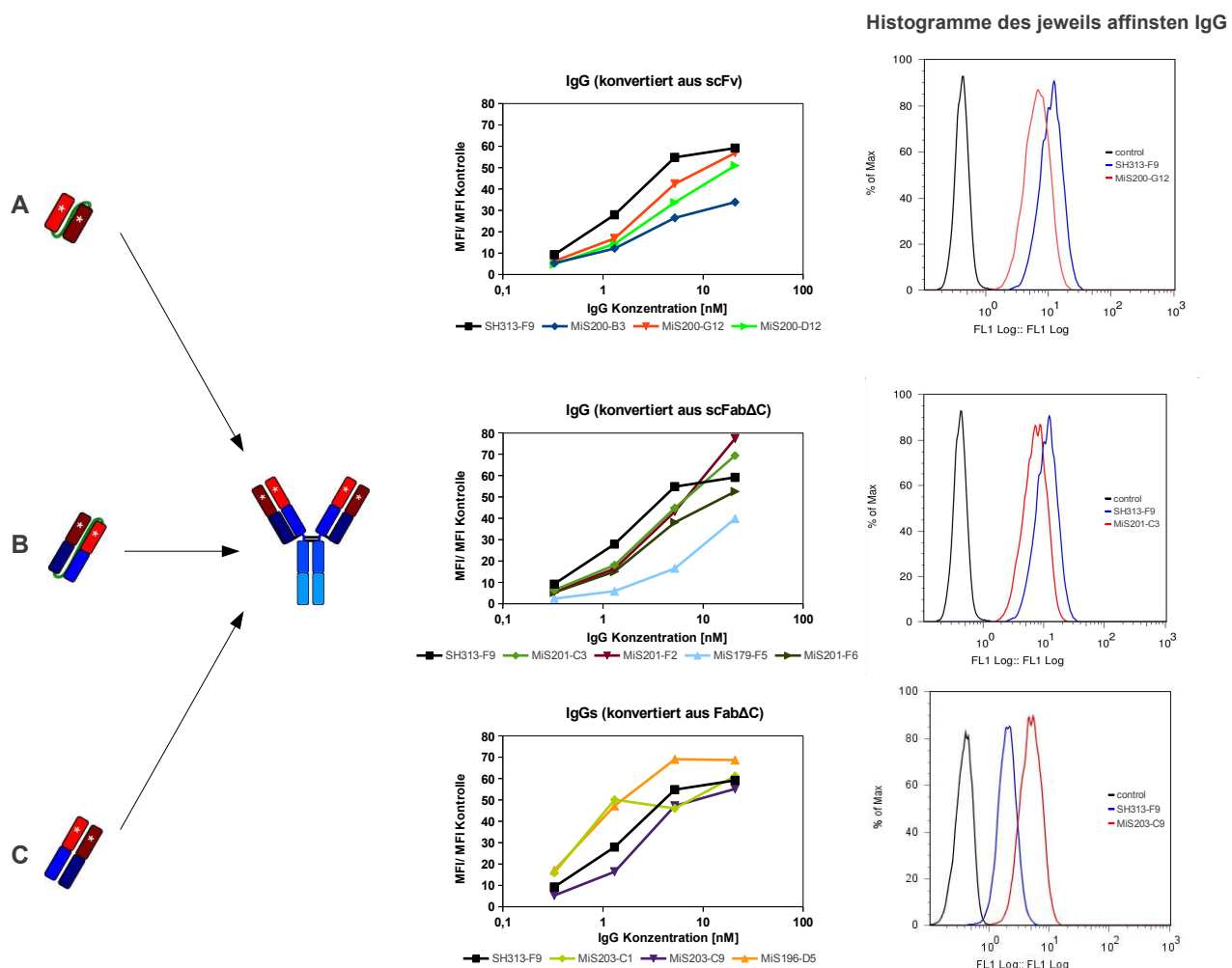


Abbildung 4.18: Bindung CD30-spezifischer Antikörpern an Karpas299-Zellen

Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindung von CD30-spezifischen IgGs, die im scFv- (A) scFab Δ C- (B) und Fab Δ C-Format (C) affinitätsgereift wurden an CD30⁺ Lymphomzellen. In der Mitte sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der gegenüber den nur mit Sekundärantikörper gefärbten Zellen dargestellt. Rechts sind die Histogramme der jeweils besten IgGs (rot) im Vergleich zum SH313-F9 IgG (blau) und der Kontrolle mit Sekundärantikörper (schwarz) dargestellt.

SPR-Analysen

Der Vergleich affinitätsgesteigerter CD30-spezifischer IgGs wurde außerdem mittels SPR durchgeführt. Dazu wurden die IgGs über einen CM5-Chip geleitet, auf dem zuvor monoklonale IgGs kovalent gebunden wurden, die spezifisch den humanen Fc-Teil der zu untersuchenden IgGs binden („*human capture* Chip“). Das anschließend injizierte CD30 konnte durch die CD30-spezifischen Antikörper gebunden werden (Assoziation), was zu einer Massenzunahme führte, die zum Messsignal korrelierte. Durch die anschließende Injektion von Laufpuffer ohne Antigen, wurde die Antikörper-Antigen-Bindung gelöst (Dissoziation), somit fällt das Messsignal wieder ab. Anhand der erhaltenden Bindungskinetik ließ sich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) der Bindung ermitteln, die ein Maß für die Affinität eines Antikörpers ist.

Die Bindungskinetik mit 500 nM CD30 wurde analysiert und die daraus resultierenden Affinitäten wurden verglichen. Signifikant höhere Affinitäten (niedrigere K_D) wurden wiederum nur für die IgGs MiS203-C9, -C1 und MiS196-D5 erhalten (Abbildung 4.19 D). Diese IgGs stammen aus der Affinitätsreifung im Fab Δ C-Format. Die Steigerung der Affinität lag bei dieser Messung zwischen einem Faktor von 3,0 – 5,9, wobei eine Verzögerung der Dissoziation beobachtet werden konnte (Abbildung 4.19 A-C). Im Gegensatz dazu wurde die überwiegende Anzahl an IgGs aus der Affinitätsreifung im scFv- bzw. scFab Δ C-Format um einen Faktor von 0,7 (0,8 bei MiS200-B3 IgG) herabgesetzt. Lediglich für einen aus dem scFab Δ C-Format konvertierten IgG (MiS201-F6) war die Affinität nahezu identisch mit der SH313-F9 IgG Affinität (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Affinitätsranking der anti-CD30 IgGs mittels SPR

IgG	K_D [M]	K_D vgl. mit SH313-F9 IgG
SH313-F9	$1,03 \times 10^7$	1,0
MiS200-B3	$1,31 \times 10^7$	0,8
MiS200-G12	$1,50 \times 10^7$	0,7
MiS200-D12	$1,47 \times 10^7$	0,7
MiS201-C3	$1,43 \times 10^7$	0,7
MiS201-F2	$1,38 \times 10^7$	0,7
MiS179-F5	$1,43 \times 10^7$	0,7
MiS201-F6	$9,45 \times 10^8$	1,1
MiS203-C1	$3,49 \times 10^8$	3,0
MiS203-C9	$1,74 \times 10^8$	5,9
MiS196-D5	$2,13 \times 10^8$	4,8

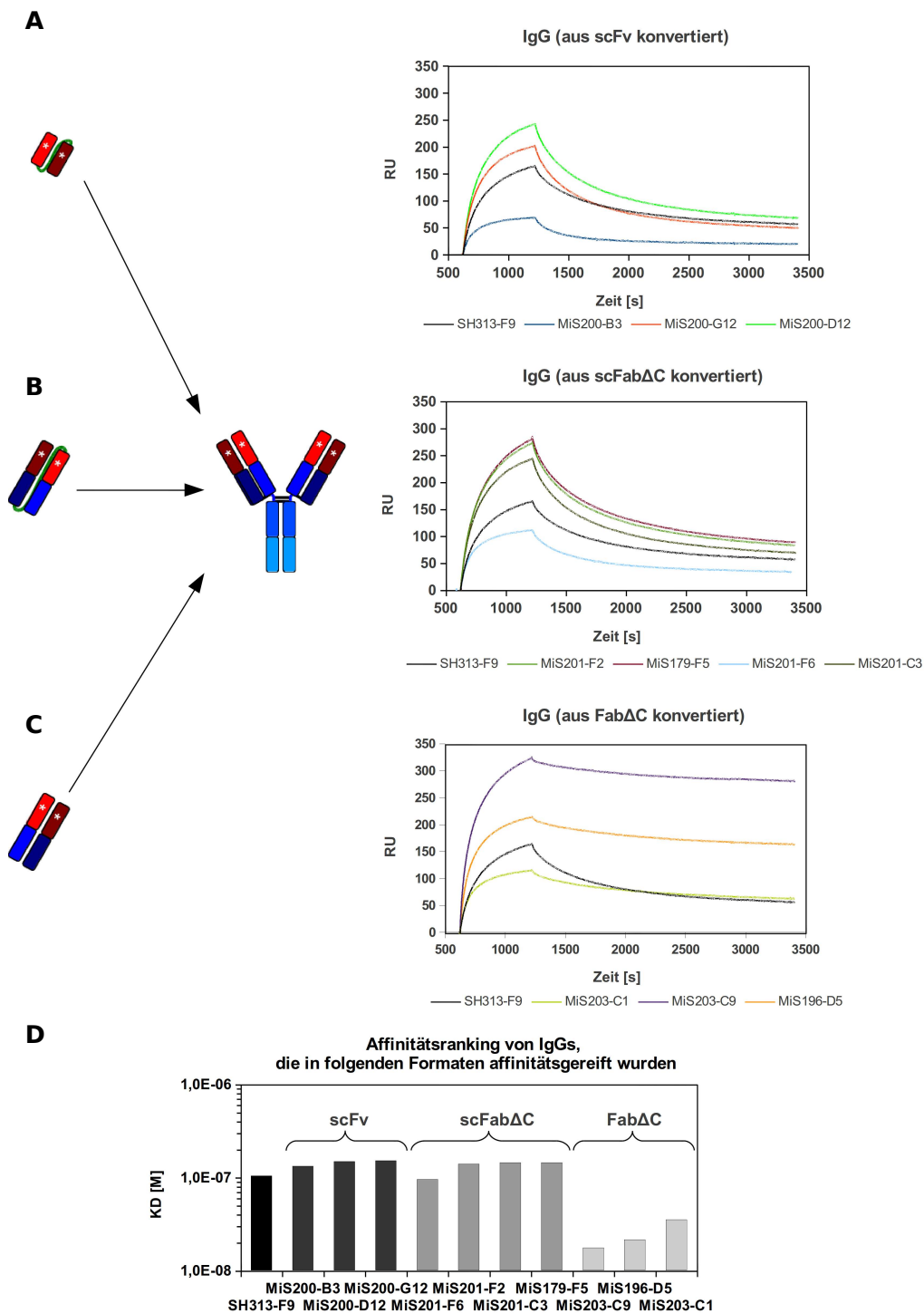


Abbildung 4.19: IgG-Affinitätsranking mittels SPR

Dargestellt sind die Sensogramme für die kinetische Messung von CD30-spezifischen IgGs, die im scFv- (A), scFabΔC- (B), und FabΔC-Format (C) affinitätsgerichtet wurden, im Vergleich zum SH313-F9 IgG. (D) Die Berechnung der Affinitäten erfolgte unter der Annahme einer 1:1 Bindung nach Langmuir mit lokal berechneten R_{max} und einer driftenden Basislinie.

Die Bindung an rekombinantes und natives CD30, sowie kinetische Messungen mittels SPR-Analysen identifizierten die IgGs MiS196-D5, MiS203-C1 und -C9 als Antikörper mit erhöhter Affinität gegenüber dem Parentalklon SH313-F9 IgG. Diese IgGs stammen aus der Reifung der Affinität im Fab Δ C-Format. Die Affinitätsreifung in den übrigen Formaten scFv und scFab Δ C lieferten keine IgGs mit gesteigerter Affinität. Die eukaryotische Produktion der IgGs MiS196-D5, MiS203-C1, und -C9, sowie des SH313-F9 im IgG-, scFv-Fc- und sclgG-Format wurden im 100 mL Maßstab wiederholt um größere Antikörpermengen für einen exakten Vergleich herzustellen.

4.4.3 Produktion und Reinigung im 100 mL Maßstab

Die Produktion der IgGs MiS196-D5, MiS203-C1, -C9 und SH313-F9, sowie des SH313-F9 scFv-Fcs und des sclgGs wurde in eukaryotische HEK293-6E-Zellen im 100 mL (IgG) bzw. 50 mL (scFv-Fc, sclgG) Maßstab durchgeführt. Die Antikörper wurden mittels Protein A Affinitätschromatographie gereinigt und die Ausbeute photometrisch bei $A_{280\text{nm}}$ bestimmt. Die Ausbeute der IgGs betrug zwischen 4 und 11 mg/L (Tabelle 4.6). Im Vergleich dazu wurde der SH313-F9 sclgG ca. 100-fach und der SH313-F9 scFv-Fc ca. 300-fach besser produziert als der als bester produzierter IgG MiS203-C1.

Tabelle 4.6: Proteinkonzentration gereinigter anti-CD30 Antikörper

Antikörper	Ausbeute [mg/L]
SH313-F9 IgG	8
MiS203-C1 IgG	11
MiS203-C9 IgG	7
MiS196-D5 IgG	4
SH313-F9 scFv-Fc	303
SH313-F9 sclgG	106

4.4.4 CD30-Bindungsstudien ausgewählter α -CD30 IgGs

Die stärkere Bindung der IgGs MiS196-D5, MiS203-C1 und -C9 gegenüber des SH313-F9 IgGs an rekombinantes bzw. natives CD30 wurde validiert. Die affinitätsgereiften IgGs banden stärker an CD30, unabhängig davon, ob das Antigen immobilisiert an MTP (Abbildung 4.20 A) oder nativ auf Karpas299-Zellen (Abbildung 4.20 B) vorlag. Die

4 Ergebnisse

Kurven der affinitätsgereiften IgGs im ELISA strebten einem höheren Grenzwert entgegen als der SH313-F9 IgG. Dies könnte beispielsweise durch eine höhere apparente Affinität durch die Bildung von Multimeren bei den affinitätsgesteigerten IgGs erklärt werden. Die Tendenz zur Multimerisierung wurde untersucht (4.4.6).

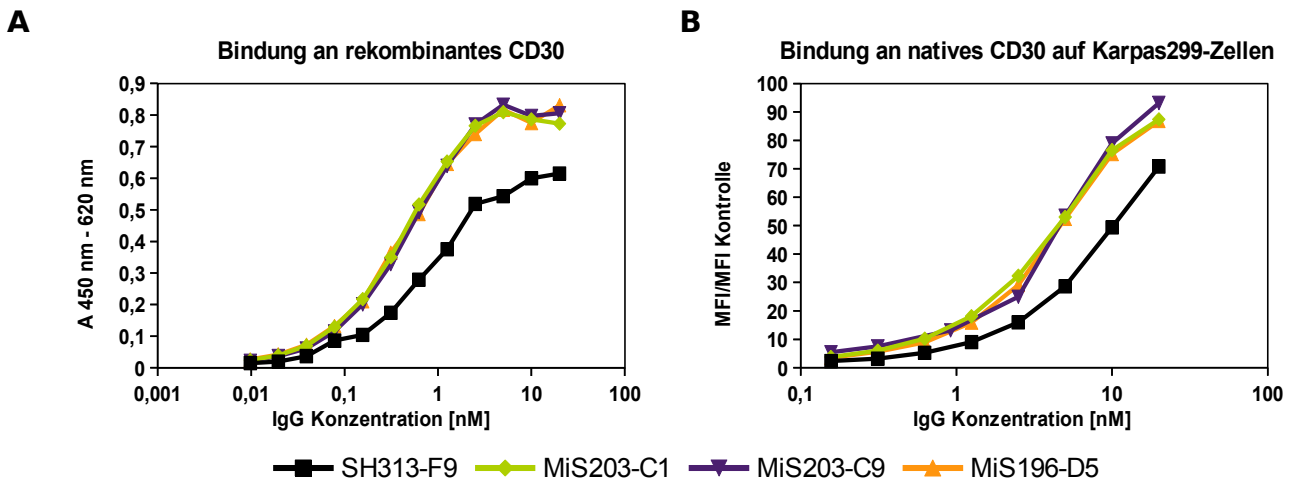


Abbildung 4.20: Bindungsstudien affinitätsgesteigerter IgGs

(A) Antigen-ELISA CD30-spezifischer IgGs. (B) Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindung von CD30-spezifischen IgGs an CD30⁺ Lymphomzellen.

4.4.5 Bestimmung der Affinitäten

SPR-Analysen wurden bereits für ein Affinitätsranking der IgGs herangezogen. Nun sollten die Affinitäten der IgGs genau bestimmt werden. Dazu wurde im Prinzip die gleiche Messanordnung wie für das Affinitätsranking durchgeführt, allerdings erfolgte diesmal die Messung mit einer Reihe von CD30-Konzentrationen, unter anderem wurde auch die Messung einer CD30-Konzentration wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Messung zu überprüfen.

In Abbildung 4.21 sind die Sensogramme der IgGs dargestellt, die Sensogramme des SH313-F9 scFv-Fcs und des scIgGs befinden sich in Abbildung A.2. Die Auswertung erfolgte mit einem mathematischen Modell, das von einer 1:1 Bindung nach Langmuir mit einer driftenden Basislinie ausgeht. Die Werte für R_{\max} wurden lokal berechnet.

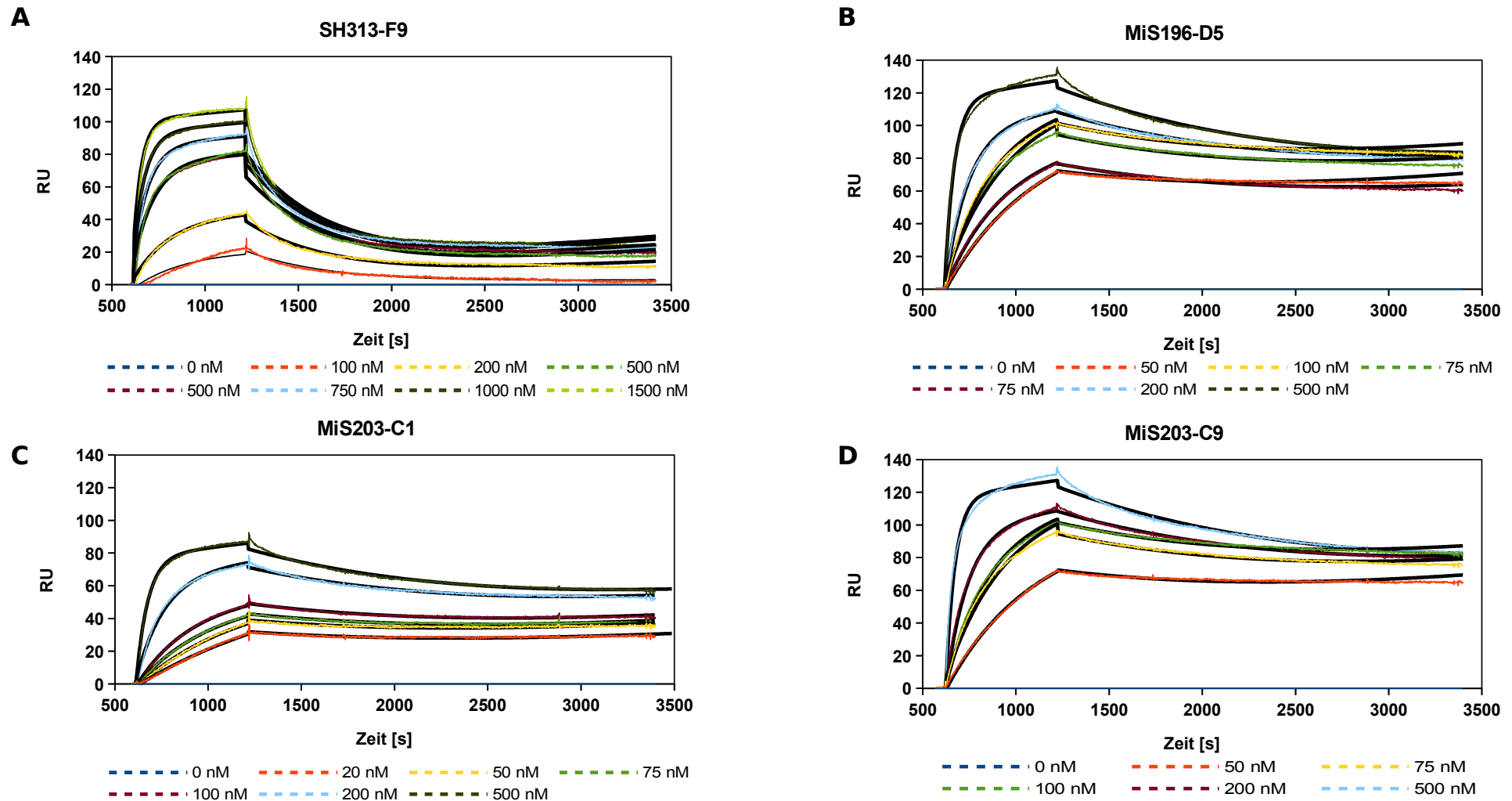


Abbildung 4.21: Analyse von Bindungskinetiken von affinitätsgereiften IgG mittels SPR

Dargestellt sind die Sensogramme der kinetischen Messung von CD30-spezifischen IgGs SH313-F9 (A), MiS196-D5 (B), MiS203-C1 (C) und MiS203-C9 (D) an CD30 unterschiedlicher Konzentrationen. Die Messungen erfolgten auf einen CM5-Chip auf dem ein monoklonaler Maus anti-human IgG (Fc-spezifisch) gekoppelt war. Anhand der in schwarz dargestellten theoretischen Kurvenverläufen des mathematischen Modells nach Langmuir mit driftender Basislinie und lokal berechneter R_{\max} wurde die Dissoziationskonstante K_D berechnet.

4 Ergebnisse

Aus den Bindungskinetiken wurde die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D , sowie die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_a bzw. der Dissoziation k_d berechnet. Die affinitätsgereiften IgGs zeichneten sich durch höhere Affinitäten (niedrigere K_D) um den Faktor von 7,9 – 12 verglichen mit SH313-F9 IgG ($1,59 \times 10^{-7}$ M) aus (Tabelle 4.7). Dabei wurde die höchste Affinität mit $1,32 \times 10^{-8}$ M für MiS203-C9 IgG bestimmt. Die Affinität des Antikörperklons SH313-F9 war im scFv-Fc- bzw. scIgG-Format gegenüber dem IgG-Format um den Faktor 0,4 bzw. 0,3 verringert.

Tabelle 4.7: Affinitäten der CD30-spezifischen Antikörper

Antikörper	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_D [M]	χ^2	Faktor der Affinitätssteigerung vgl. mit SH313-F9 IgG
SH313-F9 IgG	$1,38 \times 10^4$	$2,20 \times 10^{-3}$	$1,59 \times 10^{-7}$	2,2	1,0
MiS196-D5 IgG	$3,75 \times 10^4$	$5,42 \times 10^{-4}$	$1,45 \times 10^{-8}$	1,0	11,0
MiS203-C1 IgG	$3,03 \times 10^4$	$6,11 \times 10^{-4}$	$2,02 \times 10^{-8}$	0,3	7,9
MiS203-C9 IgG	$3,96 \times 10^4$	$5,22 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-8}$	1,2	12,0
SH313-F9 scFv-Fc	$7,18 \times 10^3$	$3,30 \times 10^{-3}$	$4,18 \times 10^{-7}$	5,3	0,4
SH313-F9 scIgG	$7,18 \times 10^3$	$3,28 \times 10^{-3}$	$4,56 \times 10^{-7}$	8,7	0,3

4.4.6 Multimerisierungstendenz affinitätsgesteigerter α -CD30 Antikörperformate

Um zu untersuchen, ob die affinitätsgereiften IgGs MiS196-D5, MiS203-C1 und -C9, sowie der Ausgangsklon SH313-F9 als IgG, scFv-Fc oder scIgG Multimere bilden, wurden diese mittels SEC untersucht.

Für die Zuordnung des Retentionsvolumen zu einer molekularen Masse, wurde eine Reihe von Proteinen mit bekannter molekularen Masse mittels SEC analysiert (Daten nicht gezeigt). Alle untersuchten IgGs wiesen nur einen Peak bei einem Retentionsvolumen von ca. 13 mL auf, der auf IgG Monomere zurückzuführen war (Abbildung 4.22). Deshalb konnten die erhöhten Absorptionen der IgGs im ELISA nicht auf Aviditätseffekte durch Multimerisierung resultieren (4.4.4). Die scFv-Fc Fusionsantikörper sowie der scIgG zeichneten sich neben dem Monomer-Peak bei ca. 13 mL durch das Vorhandensein eines zweiten Peaks bei einem Retentionsvolumen von ca. 11 mL aus, der auf die Bildung von Dimeren zurückzuführen war.

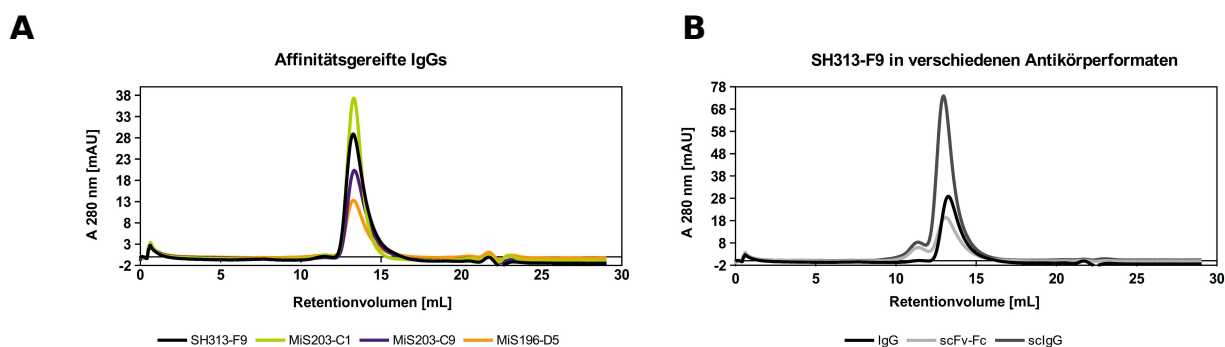


Abbildung 4.22: Aggregationsverhalten von α -CD30 IgGs, scFv-Fc und sclgG

Analytische SEC zur Bestimmung des Aggregationsverhalten der Antikörper MiS196-D5, MiS203-C1, -C9 und SH313-F9 IgG (A), sowie SH313-F9 IgG, scFv-Fc und sclgG (B). Es wurden wo möglich 100 μ g bzw. maximal 200 μ L der Antikörper aufgetragen. Dargestellt ist die Absorption bei $\lambda = 280$ nm in Bezug zum Retentionsvolumen [mL].

Um den Einfluss der Dimerbildung auf die CD30-Bindung der Antikörper zu untersuchen, wurden Fraktionen, die Monomere oder Dimere enthielten im ELISA untersucht. Durch die Bildung von Dimeren kam es bei der scFv-Fc-Fusion, wie auch beim sclgG zu einer Zunahme der Signals im ELISA (Abbildung 4.23).

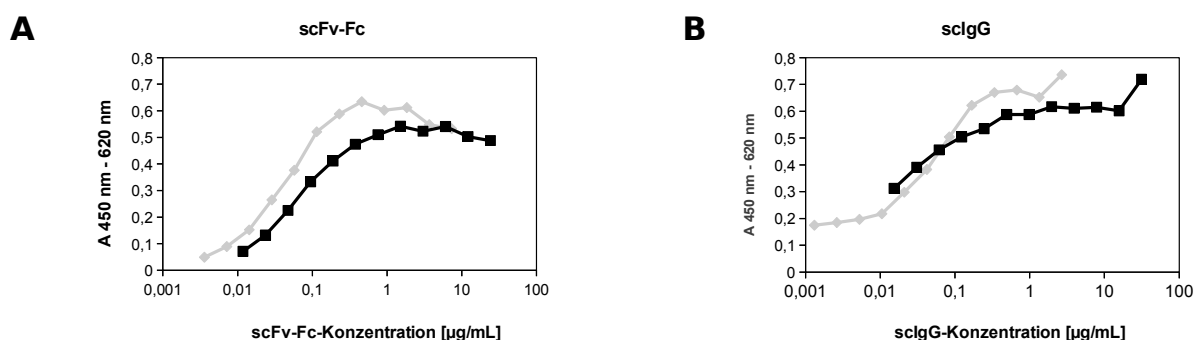


Abbildung 4.23: Bindung von Antikörper unterschiedlicher Aggregationsstadien an CD30

Antigen-ELISA mit Monomer- und Dimer-Fraktionen von SH313-F9 scFv-Fc (A) und sclgG (B)

4.5 AUSTAUSCH VON LEICHTER ODER SCHWERER IgG-KETTE AUS AFFINITÄTSGESTEIGERTEN α -CD30 ANTIKÖRPERN

Um zu überprüfen, ob sich durch die Kombination unterschiedlicher IgG-Ketten die Affinitäten der Antikörper weiter steigern lassen, wurden hier LC oder HC des SH313-F9 Antikörpers mit affinitätsgereiften IgG-Ketten kombiniert. Außerdem lassen sich dadurch möglicherweise Aussagen darüber treffen, in wie weit einzelne IgG-Ketten stärker zu einer Affinitätssteigerung beitragen.

Die Kombination von unterschiedlichen schweren und leichten IgG-Ketten wird beispielsweise beim *Chain Shuffling* angewendet (Marks, 2004; Yoshinaga et al., 2008). Hier werden verschiedene leichte Ketten mit einer schweren Kette kombiniert, um Antikörper mit gewünschten Eigenschaften zu erhalten.

4.5.1 Produktion und Reinigung von IgGs mit ausgetauschten IgG-Ketten

Wie auch die Produktion der affinitätsgereiften IgGs wurde die Produktion der IgGs mit ausgetauschten IgG-Ketten im 10 mL Maßstab durchgeführt. Die Reinigung der Proteine erfolgte mittels Protein A Affinitätschromatographie. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels *human capture* ELISA und zusätzlich mittels ECL gefärbten Immunoblot (Daten nicht gezeigt), dessen Auswertung aufgrund der niedrigen Konzentration einiger IgGs nicht durchführbar war. Es wurden IgG-Ausbeuten von unter 0,1 mg/L bis 3,2 mg/L erhalten (Tabelle A.3).

4.5.2 CD30-Bindungsstudien von IgGs mit ausgetauschten IgG-Ketten

Wieder erfolgte ein Vergleich der Antikörper mittels Titrations-ELISA mit rekombinanten CD30, durchflusszytometrischen Messungen mit CD30⁺ Karpas299-Zellen und kinetischen Messungen mittels SPR. Aufgrund der niedrigen Konzentration des IgGs mit MiS201-F2-LC wurde dieser nicht für einen Vergleich herangezogen.

Bindung an rekombinantes CD30

Definierte Mengen der IgGs wurden im ELISA mit rekombinanten CD30 untersucht. Von denen im scFv-Format affinitätsgereiften IgGs zeigte der Antikörper mit der schweren Kette des MiS200-D12 gegenüber dem Ausgangsantikörper SH313-F9 IgG eine stärkere Bindung (Abbildung 4.24 A). Von den Antikörperklonen, die im scFab Δ C-Format optimiert wurden, banden IgGs mit der schweren Kette des MiS201-F2 und -F6 oder der leichten Kette des MiS201-C3 stärker an rekombinantes CD30 (Abbildung 4.24 B). IgGs mit leichten oder schweren Ketten aus der Affinitätsreifung im Fab Δ C-Format banden im ELISA durchwegs besser als der Parentalklon SH313-F9 IgG (Abbildung 4.24 C). Besonders deutlich war der Effekt, wenn die IgGs affinitätsgereifte leichte Ketten enthielten.

Bindung an CD30⁺ Lymphomzellen

Die Bindung von IgGs mit einer affinitätsgesteigerten IgG-Kette an Karpas299-Zellen wurden mit Hilfe eines Durchflusszytometers untersucht. Dabei banden IgGs die folgende affinitätsgereifte variable Domäne enthielten besser als der SH313-F9 IgG: V_H von MiS200-D12 oder MiS201-F2, sowie IgGs mit der V_L des MiS203-C1, -C9 und MiS196-D5 (Abbildung 4.25). Die drei letztgenannten Antikörperklone stammen aus der Affinitätsreifung im Fab Δ C-Format.

4 Ergebnisse

IgG-Kettenneukombinationen

VL: SH313-F9
VH: affinitätsgereifter Klon

Format Affinitätsreifung

VL: affinitätsgereifter Klon
VH: SH313-F9

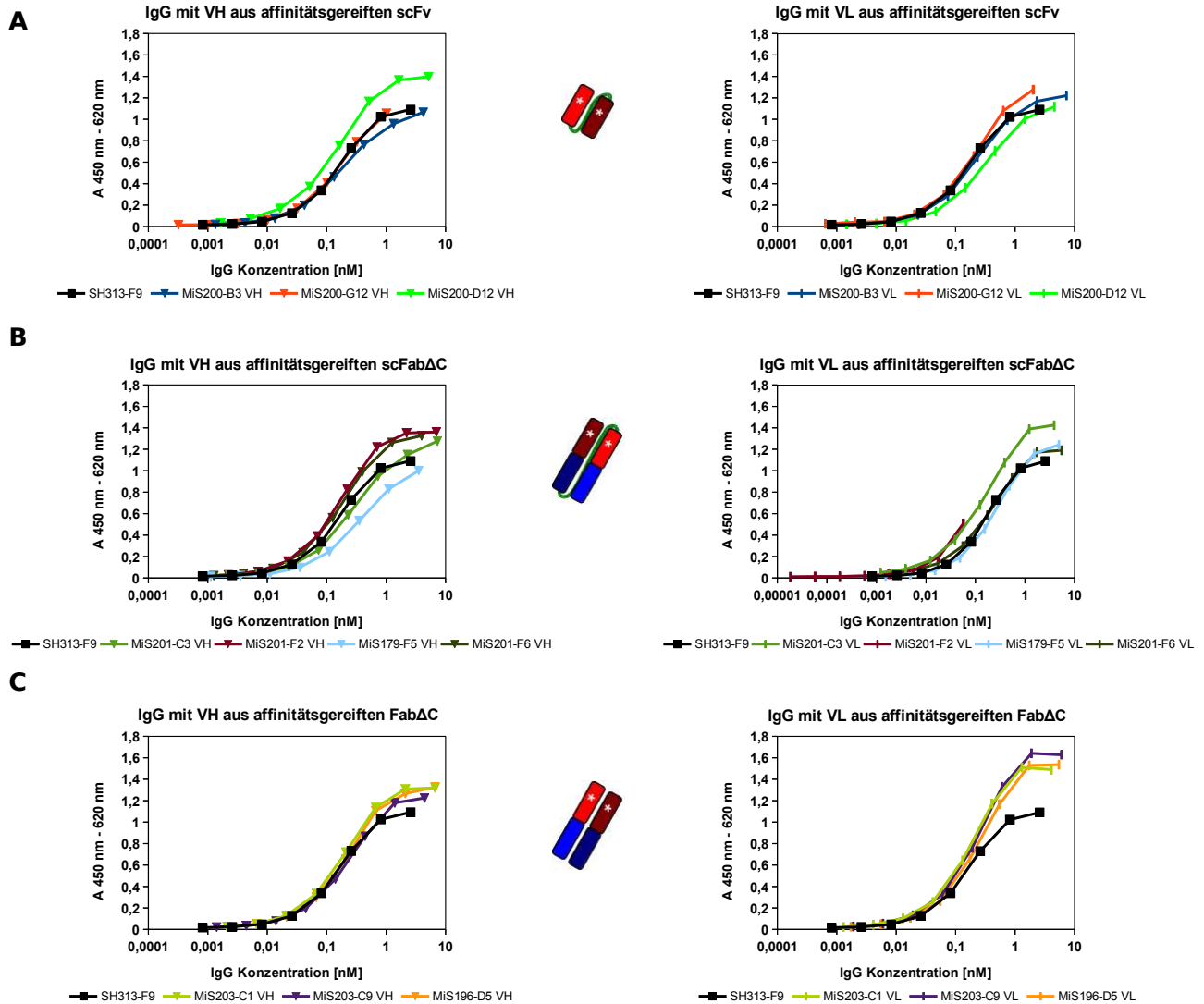


Abbildung 4.24: Bindung von CD30-spezifischen Antikörpern mit neu kombinierten IgG-Ketten an rekombinantes CD30

Antigen-ELISA mit IgG, die jeweils V_H oder V_L von Antikörperklonen aus dem scFv- (A), scFabΔC- (B) oder FabΔC-Format (C) enthielten.

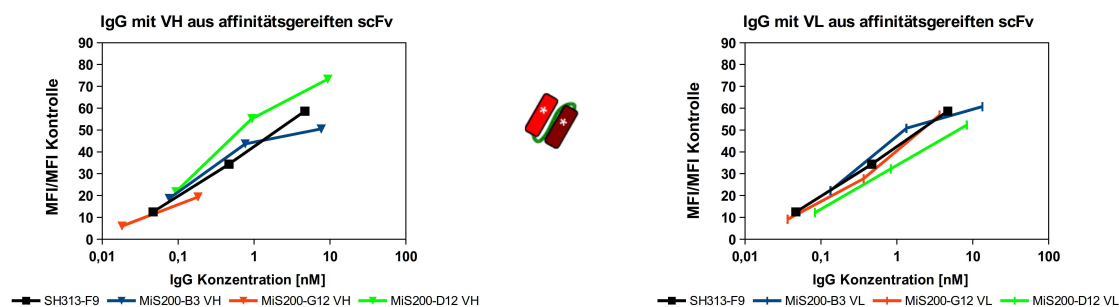
IgG-Kettenneukombinationen

VL: SH313-F9
VH: affinitätsgereifter Klon

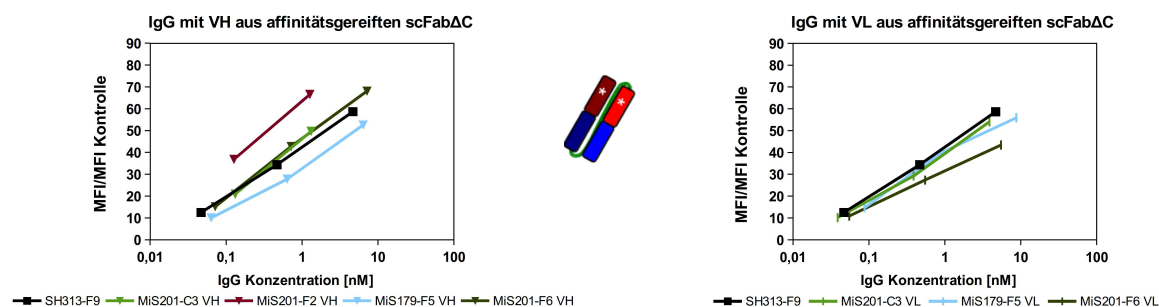
Format Affinitätsreifung

VL: affinitätsgereifter Klon
VH: SH313-F9

A



B



C

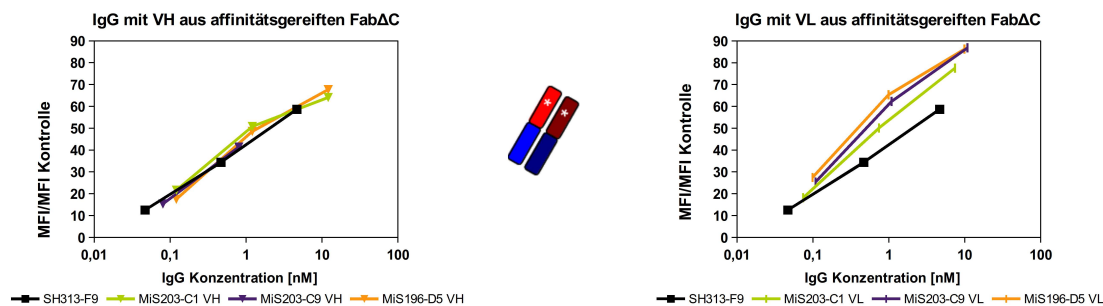


Abbildung 4.25: Bindung CD30-spezifischen Antikörpern an Karpas299-Zellen

Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindung von CD30-spezifischen IgGs, die eine variable Domäne aus der Antikörperklonen enthielten, die im (A) scFv- (B) scFabΔC- und (C) FabΔC-Format affinitätsgereift wurden, an CD30⁺ Lymphomzellen.

SPR-Analysen

Wie auch der Vergleich der affinitätsgereiften IgGs wurde der Vergleich von IgGs mit ausgetauschten IgG-Ketten durch SPR-Messungen ergänzt. Dazu wurden die IgGs über den zuvor beschriebenen *human capture* Chip geleitet.

Die Bindungskinetik mit 500 nM CD30 wurde analysiert und die daraus resultierenden Affinitäten wurden verglichen. Die überwiegende Anzahl der IgG-Varianten besaß eine bis zu zweifache erhöhte oder erniedrigte Affinitäten. Eine um den Faktor von ca. drei höhere Affinitäten (niedrigere K_D) wurden für IgGs mit HC von MiS201-C3 oder MiS201-F2 bzw. von MiS196-D5-LC bestimmt (Tabelle 4.8). Eine etwa fünffach erhöhte Affinität wurde für den IgG mit MiS203-C9-HC erhalten. Damit waren die Affinitäten der IgGs mit nur einer affinitätsgesteigerten IgG-Kette geringer, als die Affinitäten von IgGs mit beiden affinitätsgesteigerten IgG-Ketten (4.4.5).

Tabelle 4.8: Affinitäten von verschiedenen IgG-Ketten-Kombinationen

IgG		K_D [M]	K_D vgl. mit SH313-F9 IgG
V_H	V_L		
SH313-F9	SH313-F9	$1,59 \times 10^{-7}$	1
MiS200-B3	SH313-F9	$1,98 \times 10^{-7}$	0,8
MiS200-G12	SH313-F9	$1,75 \times 10^{-7}$	0,9
MiS200-D12	SH313-F9	$5,69 \times 10^{-8}$	2,8
MiS201-C3	SH313-F9	$1,20 \times 10^{-7}$	1,3
MiS201-F2	SH313-F9	$4,80 \times 10^{-8}$	3,3
MiS179-F5	SH313-F9	$1,58 \times 10^{-7}$	1,0
MiS201-F6	SH313-F9	$7,42 \times 10^{-8}$	2,1
MiS203-C1	SH313-F9	$2,03 \times 10^{-7}$	0,8
MiS203-C9	SH313-F9	$1,74 \times 10^{-7}$	0,9
MiS196-D5	SH313-F9	$1,12 \times 10^{-7}$	1,4
SH313-F9	MiS200-B3	$7,80 \times 10^{-8}$	2,0
SH313-F9	MiS200-G12	$3,33 \times 10^{-7}$	0,5
SH313-F9	MiS200-D12	nd	-
SH313-F9	MiS201-C3	$1,05 \times 10^{-7}$	1,5
SH313-F9	MiS201-F2	nd	-
SH313-F9	MiS179-F5	$9,26 \times 10^{-8}$	1,7
SH313-F9	MiS201-F6	$1,20 \times 10^{-7}$	1,3
SH313-F9	MiS203-C1	nd	-
SH313-F9	MiS203-C9	$3,06 \times 10^{-8}$	5,2
SH313-F9	MiS196-D5	$5,17 \times 10^{-8}$	3,1

Der Austausch einzelner affinitätsgereifter IgG-Ketten mit LC oder HC des Ausgangsantikörpers SH313-F9 führten gegenüber Antikörpern mit zwei affinitätsgereiften IgG-Ketten nicht zu einer Erhöhung der Affinität. Im Vergleich zum SH313-F9 IgG wiesen IgGs mit LC aus Antikörpern, die im Fab Δ C-Format affinitätsgereiften wurden eine Erhöhung der Affinität auf.

4.6 NEUKOMBINATION VON PUNKTMUTATIONEN MITTELS DNA-SHUFFLING

Um Punktmutationen affinitätsgereifter Antikörper miteinander neu zu kombinieren, wurde hier ein *DNA-Shuffling* durchgeführt. Im Gegensatz zum zuvor durchgeführten Austausch einzelner IgG-Ketten konnten durch das *DNA-Shuffling* einzelne Punktmutation, die innerhalb einer Domäne vorkommen, miteinander kombiniert werden (Stemmer, 1994a). Die neu kombinierten variablen Domänen wurden in das Phagemid pHAL34 kloniert, das die Expression von Fab Δ Cs bzw. Fab Δ C-Phagen ermöglicht. Da zuvor gezeigt wurde, dass die Konvertierung von affinitätsgereiften Fab Δ Cs auch zu gegenüber dem Parentalklon affineren IgGs führte, wurde das Fab Δ C-Format für die Generierung von neu kombinierten Antikörpergenbibliotheken genutzt.

4.6.1 Herstellung von neu kombinierten Antikörpergenbibliotheken

Für die Generierung der neu kombinierten Antikörpergenbibliotheken wurden die Gene für V_H und V_L ausgewählter affinitätsgereifter Antikörper (Tabelle A.4) mittels PCR amplifiziert. Die Amplifikation der variablen Domänen von *scFvs* und *scFab Δ Cs/Fab Δ Cs* wurde getrennt voneinander (Abbildung 4.26 A, Spur 1-4) durchgeführt.

Nach einer Optimierung der Parameter für den DNaseI-Verdau (Daten nicht gezeigt) wurde dieser mit den optimalen Parametern (Abbildung 4.26 B) mit den PCR-Produkten der variablen Domänen durchgeführt und DNA-Fragmente in der Größe bis zu 50 bp aus dem Gel eluiert. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden vereinigt und in einer speziellen PCR-Reaktion (*DNA-Shuffling*) ohne Oligonukleotide miteinander kombiniert und amplifiziert (Abbildung 4.26 A, Spur 5 und 6). In einer weiteren PCR-Reaktion mit spezifischen Oligonukleotiden wurden die variablen Domänen weiter amplifiziert (Abbildung 4.26 A, Spur 7 und 8) und in das Phagemid pHAL34 kloniert.

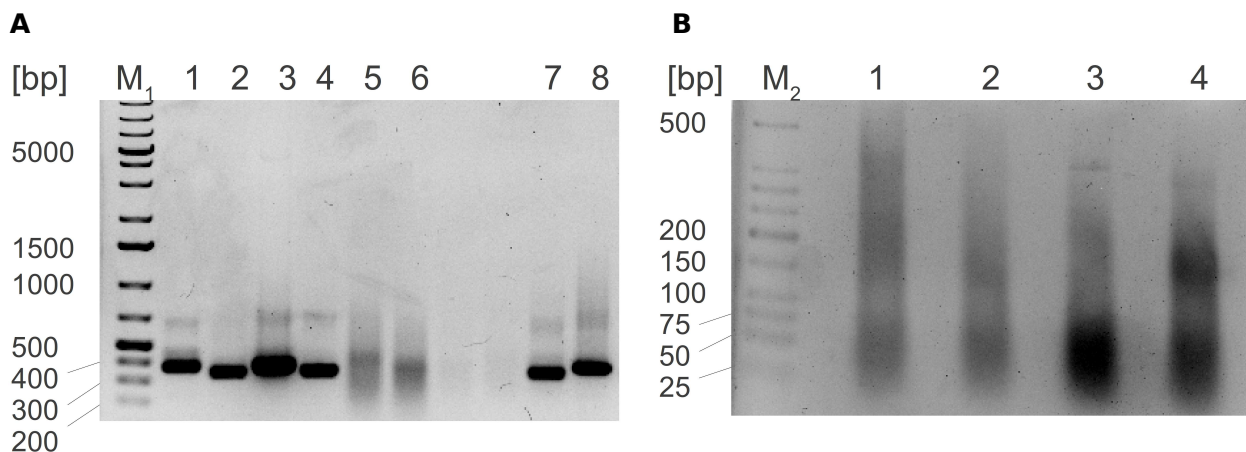


Abbildung 4.26: DNA-Shuffling des SH313-F9 Antikörpers

(A) Auf einem 1 %igen Agarosegel wurden 2 μ L der PCR-Reaktion zur Amplifikation mutierter SH313-F9 scFvs (V_H: Spur 1, V_L: Spur 2) bzw. scFab Δ Cs und Fab Δ Cs (V_H: Spur 3, V_L: Spur 4) aufgetragen. Nach einem DNaseI-Verdau der amplifizierten Antikörpergene wurden diese in einer DNA-Shuffling PCR (V_H: Spur 5, V_L: Spur 6) kombiniert und amplifiziert. Darauf folgte eine weitere PCR, in der spezifische Primer hinzugefügt wurden (V_L: Spur 7, V_H: Spur 8). (B) DNaseI-Verdau mutierter SH313-F9 scFvs (V_H: Spur 1, V_L: Spur 2) bzw. scFab Δ Cs und Fab Δ Cs (V_H: Spur 3, V_L: Spur 4). M₁: Gene Ruler 1kb plus, MBI Fermentas, M₂: Low Molecular Weight DNA Ladder, NEB

Durch Elektroporation der neu kombinierten Genbibliotheken in *E. coli* XL1-blue-MRF' wurde eine Transformationsrate von 3×10^7 cfu/mL erhalten (Tabelle 4.9). Die Verpackung der neu kombinierten Genbibliotheken mit dem Helferphagen M13K07 resultierte in einer Phagenbibliothek von 5×10^{13} cfu/mL. Der Anteil an vollständigen Antikörpergenen wurde mittels Kolonie-PCR ermittelt und lag bei 100% vor Verpackung bzw. bei 91% nach der Verpackung.

Tabelle 4.9: Eigenschaften der neu kombinierten Fab Δ C-Genbibliotheken

Theoretische Komplexität [cfu/mL]	Anteil vollständiger Antikörpergene, vor / nach Verpackung [%]	Phagentiter [cfu/mL]
3×10^7	100 / 91	5×10^{13}

4.6.2 Selektion von Antikörpern neu kombinierten Antikörpergenbibliotheken

Für die Selektion von affinitätsgereiften Fab Δ Cs aus den neu kombinierten Antikörpergenbibliotheken wurden wie zuvor Pannings durchgeführt, in denen lösliches CD30-hFc zur Competition eingesetzt wurde, um eine Assoziation von bereits dissoziierten Antikörperphagen an immobilisiertes CD30 zu erschweren. Die Menge an eluierten Phagen war umgekehrt proportional zur Menge des zur Competition eingesetzten Antigens (Abbildung 4.27). Beispielsweise wurde im Panning mit Competition durch 86 μ g CD30-hFc gegenüber einem Panning ohne Competition siebenmal weniger Phagen eluiert.

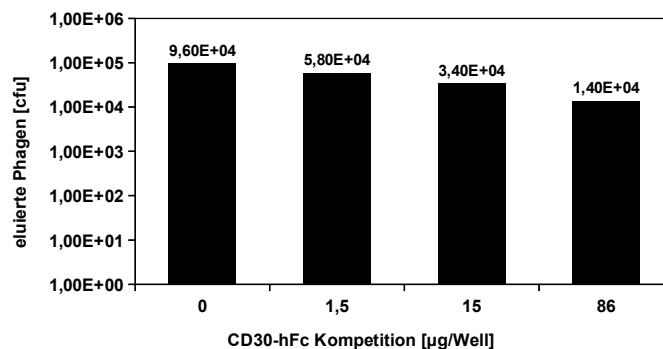


Abbildung 4.27: Einfluss der Competition durch CD30-hFc auf die Elution von Antikörperphagen aus neu kombinierten SH313-F9 Fab Δ C-Mutationsbibliotheken

Jeweils 5×10^{11} Antikörperphagen aus der neu kombinierten Antikörpergenbibliothek wurden in Pannings mit Competition durch unterschiedliche CD30-hFc-Konzentrationen eingesetzt. Es sind die Titer der eluierten Phagen in Abhängigkeit der CD30-hFc Mengen dargestellt.

Jeweils 92 Einzelkolonien der mit eluierten Phagen reinfizierten *E. coli* XI1-blue-MRF' wurden für die Produktion von Fab Δ Cs in MTP genutzt. Mit den Produktionsüberständen wurden ELISAs durchgeführt.

Unabhängig von der Menge des zur Competition eingesetzten CD30-hFcs wurden Fab Δ Cs mit erhöhter CD30-Bindung gegenüber dem SH313-F9 Fab Δ C identifiziert (Abbildung 4.28) und im Titrations-ELISA validiert (Abbildung 4.29 A-C). Exemplarisch wurden vier Fab Δ Cs aus neu kombinierten Antikörpergenbibliotheken (MiS371-E11, MiS379-B6, MiS381-A9, MiS382-F4, „zweite Generation“) mit Fab Δ Cs aus Mutationsbibliotheken (MiS203-C1, -C9, MiS196-D5, „erste Generation“) miteinander verglichen. Die Fab Δ Cs aus der zweiten Generation wiesen gegenüber den Antikörpern aus der ersten Generation eine gesteigerte CD30-Bindung auf (Abbildung 4.29 D).

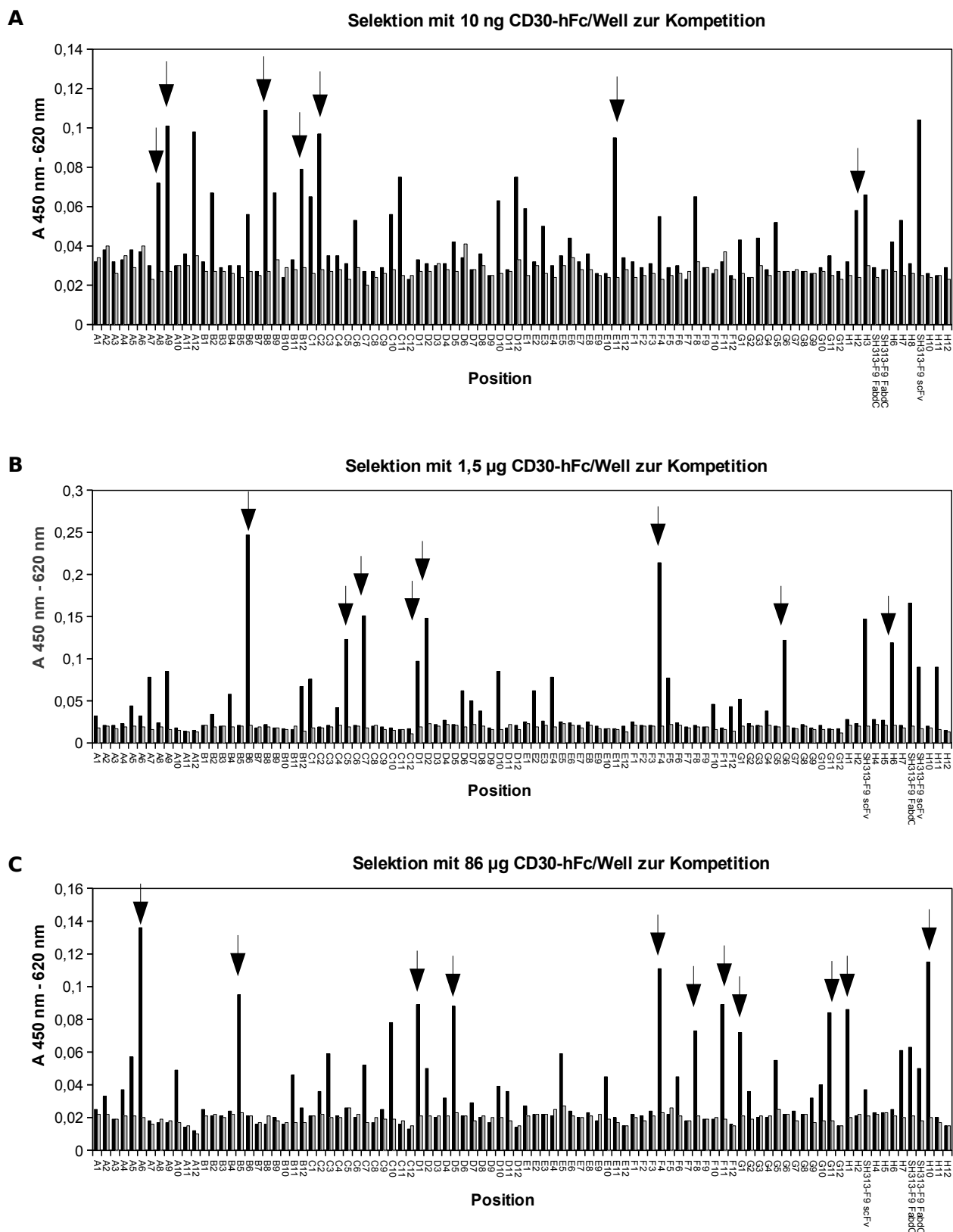


Abbildung 4.28: Identifizierung von CD30-spezifischen neu kombinierten FabΔCs aus dem Panning mit CD30-hFc-Kompetition

Screening-ELISA mit Überständen aus der MTP-Produktion von neu kombinierten FabΔCs, aus dem Panning mit 10 ng (A), 1,5 µg (B) und 86 µg (C) CD30-hFc zur Konkurrenz. Die zur weiteren Charakterisierung ausgewählten Klone sind mit schwarzen Pfeilen markiert.

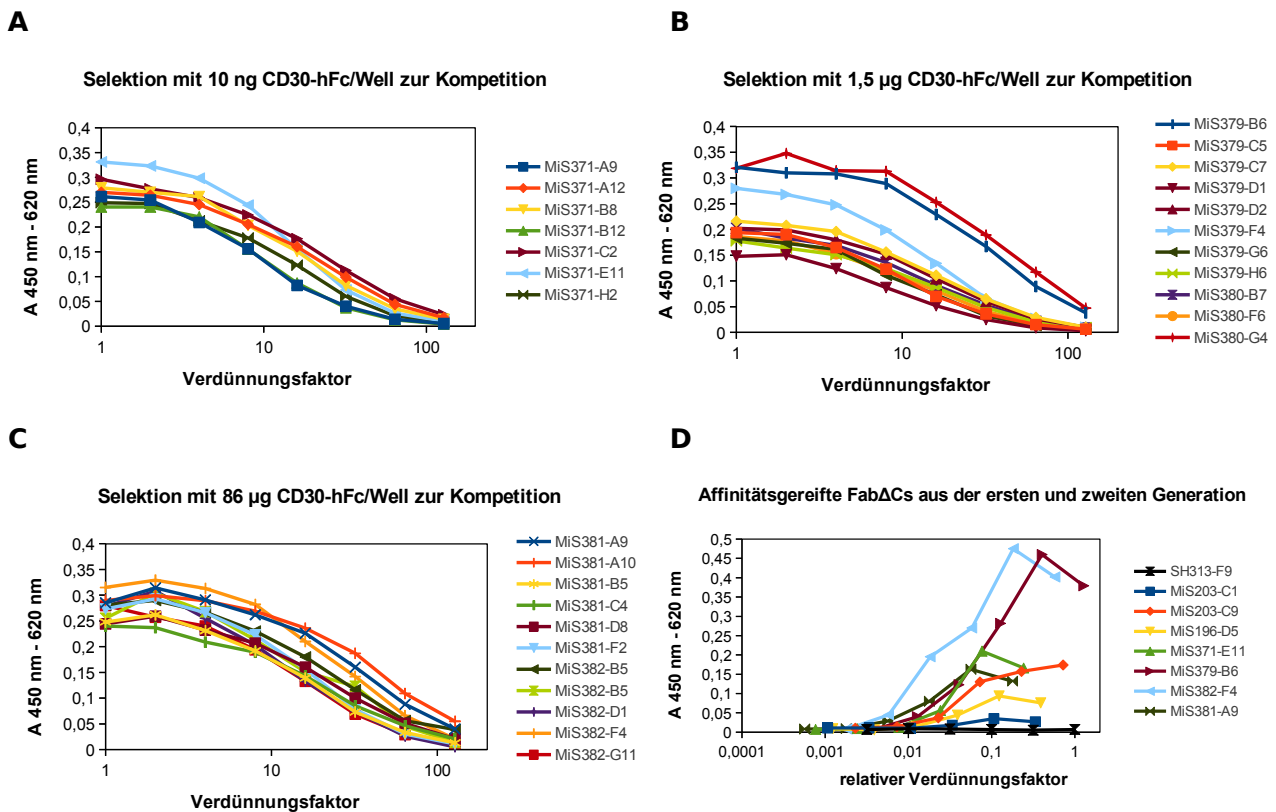


Abbildung 4.29: Vergleich der Antigenbindung von CD30-spezifischen FabΔCs

Antigen-ELISA mit Überständen aus der MTP-Produktion von FabΔCs. Die Antikörperklone wurden durch Pannings mit Konkurrenz von 10 ng CD30-hFc/Well (A), 1,5 µg CD30-hFc/Well (B), 86 µg CD30-hFc/Well (C) selektiert. (D) Antigen-ELISA zum Vergleich affinitätsgereifter FabΔCs aus der ersten und zweiten Generation. Die Konzentrationen der Antikörper wurden durch einen immungefärbten Western-Blot bestimmt.

Die Sequenzanalyse von 26 validierten Antikörperklonen ergab, dass diese gegenüber den Antikörpern, die zur Konstruktion der Genbibliotheken der zweiten Generation eingesetzt wurden neue Sequenzen besaßen. Die FabΔCs der zweiten Generation hatten individuelle AS-Sequenzen, allerdings gab es vier leichte Ketten, die in mehreren Antikörperklonen auftraten. So kamen zwei V_L s zweimal, eine V_L dreimal und eine V_L fünfmal in den 26 Antikörperklonen vor (Abbildung 4.30). Alle untersuchten schweren Ketten hatten hingegen individuelle Sequenzen. Zusätzlich zu den Mutationen, die in der für die Konstruktion der Genbibliotheken durchgeführten PCR als DNA-Matrize enthalten waren, wurden neue Mutationen gefunden. So waren 15% der AS-Substitutionen auf neue Mutationen zurückzuführen, von denen die Mehrheit (28 von 33) in der V_H auftraten. Im Gegensatz dazu waren 26% der in den DNA-Matrizen vorgekommenen AS-Substitutionen nicht mehr in den untersuchten Antikörperklonen enthalten. Insgesamt wurde die Anzahl an AS-Substitutionen

verglichen mit denen als DNA-Matrizen eingesetzten Antikörperklonen von durchschnittlich 4,1 auf 7,3 Substitutionen je Antikörperklon erhöht, davon wurden nun 4,5 (zuvor 2,4) Substitutionen in V_H und 2,8 (zuvor 1,8) Substitutionen in V_L pro Antikörperklon gefunden.

Zwei *hot spots* für AS-Substitutionen traten in den Antikörpersequenzen auf: 25 der 26 Antikörperklone wiesen die gleiche AS-Substitution an Position drei von V_L -FR3 auf, die in den drei affinitätsgesteigerten Fab Δ Cs aus der ersten Generation vorhanden waren. Die erste Position von V_H -CDR3 war bei allen Antikörperklonen der zweiten Generation in dieselbe Aminosäure substituiert. Dieser *hot spot* trat auch bei den Antikörperklonen der ersten Generation unabhängig vom Antikörperformat auf. Darüber hinaus traten gleiche AS-Substitutionen an weiteren Positionen auf, vor allem in CDR2 und FR3 von V_H . Von verhältnismäßig wenigen AS-Substitutionen betroffen waren die Bereiche CDR1, FR2 und -4 von V_H und V_L . Im Gegensatz dazu gab es nur eine Substitutionen in V_L - CDR2.

V _H	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
SH313-F9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MiS379-B6	-----	-----	-----	█	-----	█	-----
MiS382-F4	-----	-----	-----	█	█	█	-----
MiSS381-A9	█ █	-----	-----	█	█ █ █	█	-----
MiSS382-D1	-----	-----	-----	█	█	█	█
MiS371-E11	-----	-----	-----	█	-----	█	█
MiS381-F2	-----	-----	-----	█ █	█	█ █	-----
MiS380-F6	█	-----	-----	-----	█	█	-----
MiS381-D8	-----	-----	-----	█	-----	█ █	-----
MiS381-E4	█	-----	-----	-----	█ █	█	-----
MiS382-G11	-----	-----	-----	█	█ █ █	█	-----
MiS371-C1	-----	-----	-----	█ █	█	█	-----
MiS382-D5	-----	-----	-----	█ █	-----	█	-----
MiS371-A12	█	-----	-----	█ █	█	█	-----
MiS380-B7	█ █	-----	-----	█	-----	█	-----
MiSS379-F4	█	-----	-----	-----	█ █	█	█
MiS371-A9	-----	-----	-----	█	█ █	█	█
MiS380-G4	-----	█	█	-----	█	█	-----
MiS372-H2	-----	-----	-----	-----	█	█	-----
MiS372-D11	█	-----	-----	-----	█	█	-----
MiS381-A10	█	-----	-----	-----	█	█	█
MiS381-B5	█	-----	-----	-----	█	█	-----
MiS372-H1	-----	-----	-----	-----	█ █	█	-----
MiS382-A6	█	-----	-----	█	█	█	-----
MiS381-G6	-----	-----	-----	█	█ █ █	█	-----
MiS371-B12	█	█	█	█	█ █ █	█	-----
MiS382-B5	█ █	-----	-----	-----	█ █ █ █	█	-----

V _L	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	Häufigkeit ¹
SH313-F9	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	0
MiS379-B6	-----■-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	3
MiS382-F4	-----	-----	-----	---	■-----	-----■-----	-----	2
MiSS381-A9	-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	5
MiSS382-D1	-----	-----■-----	-----	---	■-----	-----■-----	-----	1
MiS371-E11	-----■-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	2
MiS381-F2	-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	5
MiS380-F6	-----■-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	3
MiS381-D8	-----	-----■-----	-----	---	■-----	-----	-----	1
MiS381-E4	-----	-----■-----	-----■-----	---	■-----	-----	-----	1
MiS382-G11	-----■-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	1
MiS371-C1	-----■-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	3
MiS382-D5	-----	-----	-----	---	■-----	-----■-----	-----	1
MiS371-A12	-----■-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	1
MiS380-B7	-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	5
MiSS379-F4	-----■-----	-----	-----	---	■-----■-----	-----■-----	-----	1
MiS371-A9	-----■-----	-----■-----	-----	---	■-----■-----	-----	-----	1
MiS380-G4	-----	-----	-----	---	-----■-----	-----■-----	-----	1
MiS372-H2	-----	-----	-----	---	■-----	-----■-----	-----	2
MiS372-D11	-----	-----	-----	---	■-----■-----	-----	-----	1
MiS381-A10	-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	5
MiS381-B5	-----	-----	-----	---	■-----	-----■-----	-----	1
MiS372-H1	-----■-----■-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	1
MiS382-A6	-----■-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	2
MiS381-G6	-----	-----	-----	-----■-----	■-----■-----	-----	-----	1
MiS371-B12	-----	-----	-----	---	■-----	-----	-----	5
MiS382-B5	-----	-----■-----	-----	---	■-----■-----	-----■-----	-----	1

Abbildung 4.30: AS-Sequenzvergleich von CD30-spezifischen FabACs aus neu kombinierten Antikörpergenbibliotheken

Die AS-Sequenzen SH313-F9 Varianten wurden mittels VBASE2 in FR- und CDR-Bereiche eingeteilt. ■ kennzeichnet eine Mutation, die auch bei denen als DNA-Matrize genutzten Antikörperklonen vorhanden war, □ kennzeichnet eine Mutation, die nicht bei denen als DNA-Matrize genutzten Antikörperklonen vorhanden war. ¹ aus 26

4.6.3 Klonierung und Produktion von neu kombinierten IgGs

Von den selektierten Antikörperklonen aus der zweiten Generation wurden die drei Fab Δ Cs MiS379-B6, MiS381-A9 und MiS382-F4 in das IgG-Format überführt und in HEK293-6E-Zellen produziert. Nach affinitätschromatographischer Reinigung mittels Protein A wurden Ausbeuten zwischen 2 und 9 mg/L erhalten.

4.6.4 CD30-Bindungsstudien neu kombinierter IgGs

Die mittels DNA-*Shuffling* generierten IgGs wurden mit dem MiS203-C9 IgG der ersten Generation und dem Ausgangsklon SH313-F9 IgG hinsichtlich der Bindung an rekombinantes und natives CD30 verglichen. Dazu wurde ein Titrations-ELISA mit rekombinanten CD30-hFc, sowie durchflusszytometrische Messungen mit verschiedenen Lymphomzellen durchgeführt. Die Antikörper der zweiten Generation banden als IgG sowohl an rekombinantes (Abbildung 4.31 A), als auch an natives CD30 (Abbildung 4.31 B-C) stärker als die beiden Referenz-IgGs MiS203-C9 und SH313-F9.

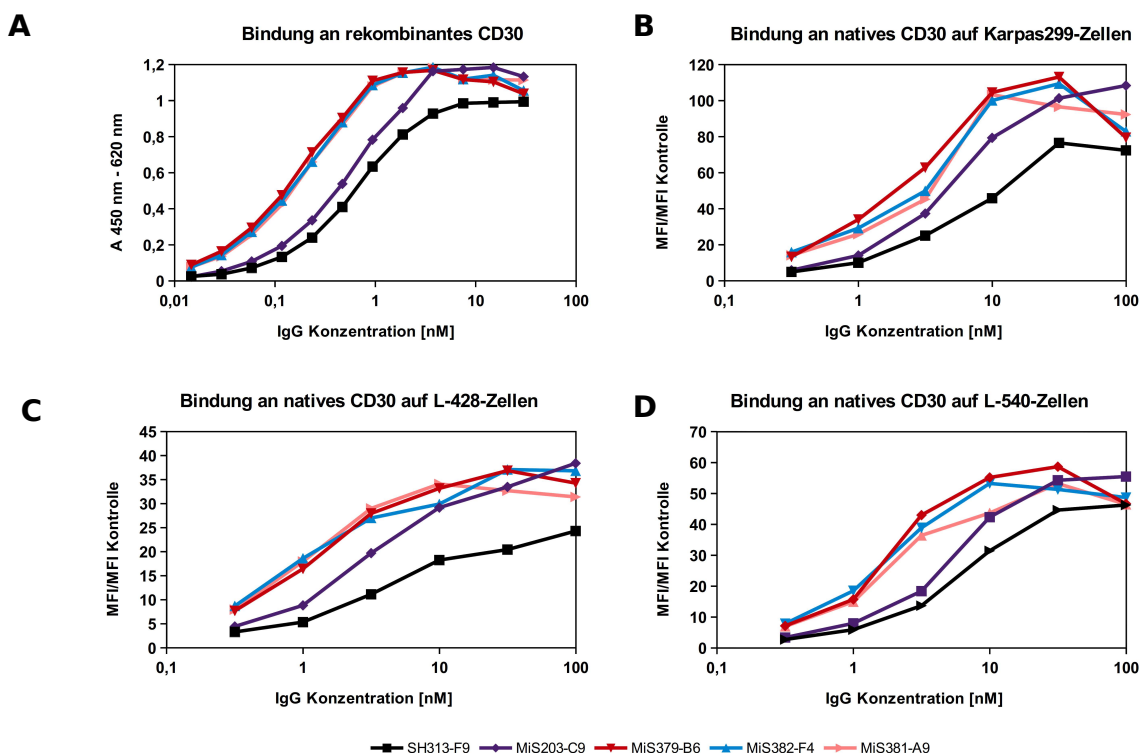


Abbildung 4.31: Bindungsstudien affinitätsgesteigerter IgGs

Antigen-ELISA affinitätsgereifter IgGs aus der 2. Generation im Vgl. zum SH313-F9 und MiS203-C9 IgG (A). Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindung von CD30-spezifischen IgGs an CD30⁺ Karpas299- (B), L428 (C), L-540-Zellen (D).

4.6.5 Affinitätsbestimmung neu kombinierter IgGs

Die Bestimmung der Affinitäten der IgGs erfolgte mittels SPR-Analysen. Dazu wurden die IgGs mittels *human capture* Chip gebunden und die Assoziation und Dissoziation von bis zu 500 nM CD30 untersucht. Die Ergebnisse aus dem 1:1 *fitting* nach Langmuir mit driftender Basislinie und lokal bestimmten R_{Max} sind in der nachfolgenden Tabelle 4.10 zusammengefasst. Die dazugehörigen Sensogramme befinden sich in Abbildung A.3.

Tabelle 4.10: Affinitäten der IgGs (ermittelt aus SPR-Analysen)

IgG	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_D [M]	χ^2	K_D vgl. mit SH313-F9 IgG
SH313-F9	$1,38 \times 10^4$	$2,20 \times 10^{-3}$	$1,59 \times 10^{-7}$	2,2	1
MiS379-B6	$2,49 \times 10^4$	$3,01 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-8}$	3,1	13
MiS382-F4	$4,63 \times 10^4$	$5,15 \times 10^{-4}$	$1,11 \times 10^{-8}$	0,2	14
MiS381-A9	$4,81 \times 10^4$	$2,94 \times 10^{-4}$	$6,12 \times 10^{-9}$	1,2	26
MiS203-C9	$5,22 \times 10^4$	$5,22 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-8}$	1,2	12

Die affinitätsgereiften IgGs aus der zweiten Generation wiesen gegenüber dem Parentalklon SH313-F9 IgG eine um den Faktor 13-26 erhöhte Affinität auf. Die Erhöhung der Affinitäten war stärker auf eine verlangsamte Dissoziation als auf eine Beschleunigung der Assoziation zurückzuführen.

4.6.6 Multimerisierungstendenz neu kombinierter IgGs

Die IgGs MiS379-B6, MiS381-A9 und MiS382-F4 wurden mittels SEC untersucht. Die untersuchten IgGs lagen ausschließlich als Monomer vor (Abbildung 4.32). Eine erhöhte CD30-Bindung war also nicht auf eine höhere apparente Affinität durch die Bildung von Multimeren zurückzuführen.

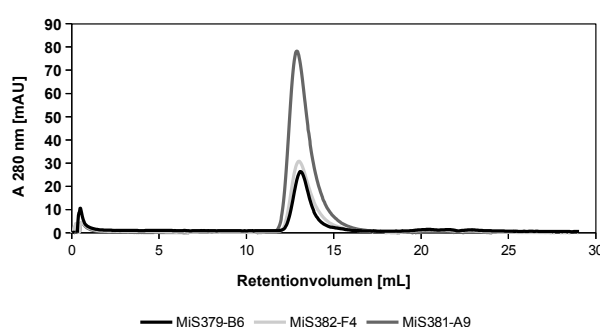


Abbildung 4.32: SEC-Analyse affinitätsgesteigerter IgGs aus der 2. Generation

Analytische SEC zur Bestimmung des Aggregationsverhalten der IgGs MiS379-B6, MiS382-F4 und MiS381-A9. Es wurden wo möglich 100 μg (maximal 200 μL) der Antikörper aufgetragen.

4.6.7 Stabilität affinitätsgesteigerter Antikörper

Um Aussagen über die Stabilität des SH313-F9 IgGs sowie der affinitätsgereiften IgGs aus der ersten und zweiten Generation zu erhalten, wurden diese 30 Minuten bei Temperaturen von 37°C-70°C inkubiert und anschließend ihre Bindung an CD30 im ELISA untersucht. Die CD30-Bindung aller IgGs nahm nach der Inkubation mit steigender Temperatur ab (Abbildung 4.33). Nach 30 minütiger Inkubation bei 70°C war bei keinem IgG eine Bindung an CD30 nachweisbar. Die Bindung an das Kontroll-Antigen BSA war unabhängig von der Inkubationstemperatur konstant niedrig ($A_{450\text{nm}} < 0,012$, nicht gezeigt). Die Abnahme der CD30-Bindung der IgGs SH313-F9 und MiS203-C9 war auch bei niedrigeren Inkubationstemperaturen relativ kontinuierlich. Im Gegensatz dazu war die Abnahme der CD30-Bindung mit steigenden Temperaturen bei den übrigen IgGs verzögert. So hatten alle IgGs außer der MiS203-C9 bei Temperaturen bis 50°C eine erhöhte Aktivität gegenüber dem Parentalklon SH313-F9 IgG. Eine deutlich erhöhte Aktivität auch bei hohen Temperaturen bis 65°C gegenüber dem SH313-F9 IgG war bei den IgGs MiS379-A9 und MiS382-F4 zu verzeichnen.

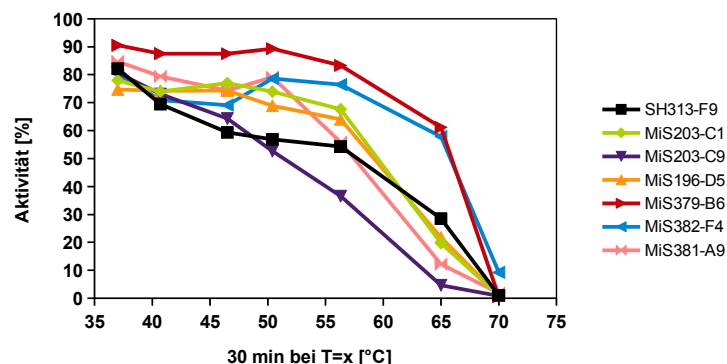


Abbildung 4.33: Temperaturstabilität affinitätsgesteigerter IgGs

Antigen-ELISA mit IgGs, die zuvor 30 Min. bei Temperaturen von 37-70°C inkubiert wurden. Das ELISA-Signal eines Aliquots von bei 4°C gelagerten Antikörpern wurde als Referenz für 100 % Aktivität verwendet

5 DISKUSSION

Monoklonale Antikörper werden für die Therapie unterschiedlicher Krankheiten meist im IgG-Format eingesetzt (Chan und Carter, 2010; Weiner et al., 2010). Für die Weiterentwicklung von Antikörpern *in vitro*, beispielsweise zur Affinitätssteigerung, wird allerdings mit kleineren Antikörperfragmenten gearbeitet. Möchte man die entwickelten Antikörperfragmente wieder in ein vollständiges IgG-Format überführen, kann dies zu einer Verringerung der Affinität des Antikörpers führen (Thie et al., 2011). Deshalb ist eine effiziente Strategie zur Affinitätsreifung von Antikörpern erstrebenswert, bei der die Affinität des Antikörperfragments bei der Konvertierung in das IgG-Format nicht verringert wird.

Durch die Affinitätsreifung *in vivo* können Antikörper teilweise Affinitäten im unteren picomolaren Bereich erreichen. Es existiert allerdings eine Theorie, welche die Affinität, die *in vivo* erhalten wird auf 0,1-1 nM begrenzt (Batista und Neuberger, 1998; Foote und Eisen, 1995). An der Affinitätsreifung von Antikörpern *in vivo* sind die Prozesse der somatischen Hypermutation in den Antikörpergenen und der klonalen Selektion von B-Lymphozyten beteiligt (Defrance et al., 2002; Kocks und Rajewsky, 1988). Diese Prozesse können *in vitro* nachgebildet werden, indem Zufallsmutationen in die Antikörpergene eingeführt werden und Antikörper mit höherer Affinität selektiert werden (Daugherty et al., 1998; Martineau, 2002; Siegel, 2009; Thie et al., 2009; Zhao et al., 2009).

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit waren bereits affinitätsgesteigerte scFvs des MUC1-spezifischen Antikörpers IIB6 (Thie et al., 2011). Um die Eignung des scFv-Formats für die Affinitätsreifung von IgGs zu überprüfen, wurden die MUC1-spezifischen scFvs in den Formaten IgG und scFv-Fc mit dem Ausgangsklon IIB6 verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass im scFv-Format affinitätsgereiften Antikörper nicht immer IgGs mit erhöhter Affinität gegenüber dem Ausgangsklon waren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden verschiedene Strategien für eine *in vitro* Affinitätsreifung von CD30-spezifischen Antikörpern, die zuvor aus der naïven, humanen scFv-Genbibliothek HAL7 isoliert wurden (Wezler et al., 2012), untersucht. Dabei lag der Fokus auf der Entwicklung einer effizienten Strategie für die Affinitätssteigerung von IgGs. Um den Einfluss des Antikörperformats auf die Affinitätsreifung mittels Phagen-Display zur Generierung von IgGs zu untersuchen,

5 Diskussion

wurden Mutationsbibliotheken von CD30-spezifischen Antikörpern in verschiedenen Antikörperformaten erstellt. Mittels Phagen-Display konnten affinitätsgesteigerte Kandidaten in den Formaten scFv, scFab Δ C und Fab Δ C identifiziert werden. In Bindungsstudien der Antikörper im IgG-Format wurde gezeigt, dass nur im Fab Δ C-Format affinitätsgereifte Antikörper eine gesteigerte Affinität gegenüber dem Ausgangsantikörper SH313-F9 IgG besaßen.

Des Weiteren wurden die IgG-Ketten affinitätsgereifter Kandidaten neu kombiniert (*Chain Shuffling*) und ein DNA-*Shuffling* zur Affinitätsreifung angewendet. Durch das DNA-*Shuffling* wurden verschiedene IgG-Varianten des Ausgangsklons SH313-F9 generiert, deren Bindung an rekombinantes und natives CD30 weiter gesteigert werden konnten.

5.1 AFFINITÄTSREIFUNG IM scFv-FORMAT FÜR DIE ENTWICKLUNG VON IgGs

Die im scFv-Format affinitätsgereiften Antikörper HT186-B7, -D11 und -G2 (Thie et al., 2011) wurden mit dem Ausgangsklon IIB6 (Tolékis, 2004) hinsichtlich der Bindung an das Antigen MUC1 verglichen. Dazu wurden die Antikörper in den Formaten scFv-Fc, IgG und scIgG-Format (nur HT186-D11) rekombinant hergestellt.

Die Ausbeuten der Antikörper war abhängig vom Format. Die höchsten Ausbeuten wurden im scFv-Fc-Format erhalten. Diesem Format fehlen gegenüber dem IgG und scIgG die konstanten Domänen C_H1 und CL, wodurch die Komplexität des Moleküls abnimmt. Ein weiterer Vorteil für die Produktion scheint das einkettige Format, sowie das Fehlen der intermolekularen Disulfidbrücke zwischen HC und LC in scFv-Fc-Fusionen und scIgGs gegenüber dem IgG zu sein, da IgGs unter den analysierten Formaten die geringsten Ausbeuten lieferten. Die Produktion von IgGs wird durch das Verhältnis von HC zu LC beeinflusst (Li et al., 2007), was wiederum durch das einkettige Format bei scFv-Fc und scIgG umgangen wird.

Im IgG-Format waren die Ausbeuten der affinitätsgereiften Kandidaten gegenüber dem Parentalklon IIB6 höher, jedoch korrelierte die Affinität nicht direkt mit der Produktionsausbeute im IgG-Format: So war die Ausbeute des IgGs mit der höchsten Affinität, HT186-D11, bezogen auf andere affinitätsgereifte Kandidaten mittelmäßig. Die Affinitätsreifung des IIB6 im scFv-Format wirkte sich also generell positiv auf die IgG-Ausbeuten aus.

Um den Einsatz des scFv-Formats für die Affinitätsreifung von IgGs zu überprüfen, wurde die Bindung der Antikörper in den verschiedenen Formaten (insbesondere scFv-Fc und IgG) und Aggregationsstadien (Mono-, Di- und Trimere) an MUC1-Peptid untersucht. Obwohl im scFv-Fc-Format alle affinitätsgereiften Varianten eine stärkere Bindung an MUC1-Peptid aufwiesen als der Parentalklon IIB6, war die erhöhte MUC1-Peptid-Bindungsstärke für affinitätsgereifte Varianten nicht immer auf das IgG-Format übertragbar: So band der im scFv Format affinitätsgereifte HT186-G2 als IgG weniger stark an MUC1-Peptid als der Parentalklon IIB6 IgG. Dieses Beispiel zeigte, dass sich die Affinitätsreifung im scFv Format negativ auf die Affinität von IgGs auswirken kann.

Auffällig war die starke Zunahme der MUC1-Peptid-Bindung des Ausgangsklons IIB6 im Gegensatz zu den affinitätsgereiften Kandidaten durch den Formatwechsel von scFv-Fc

nach IgG. Das Material, das zur Generierung der Phagen-Display-Bibliothek verwendet wurde, aus welcher der IIB6 scFv isoliert wurde, stammt aus mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid immunisierten Mammakarzinom-Patientinnen (Tolékis, 2004). Das Antikörpergen des IIB6 wurde also aus peripheren B-Lymphozyten isoliert und der Prozess der natürlichen Selektion funktionaler B-Zellrezeptoren und Antikörper *in vivo* war deshalb in einem natürlich vorkommenden Antikörperformat schon abgeschlossen. Bedingt durch die Konstruktion der Antikörpergenbibliotheken kommt es lediglich zu neuen Kombination von V_H und V_L , die *in vivo* nicht vorgekommen sind. Dennoch scheinen Antikörper, die aus Antikörpergenbibliotheken isoliert wurden, deren Antikörpergene bereits *in vivo* vorgelegen haben, eine Affinitätssteigerung durch die Stabilisierung beim Formatwechsel vom scFv in IgG zu erfahren.

Bei der Konvertierung von Botulinum-Neurotoxin-A- (BoNT-A) spezifischen scFvs in das IgG-Format kam es ebenfalls zu einer Steigerung der Affinität (Nowakowski et al., 2002). Diese scFvs wurden aus Phagen-Display-Bibliotheken isoliert, die aus Material aus mit der BoNT-A-Bindedomäne immunisierten Mäusen sowie mit pentavalenten Botulinum Toxoid immunisierten Menschen generiert wurde. Demnach haben auch diese Antikörper bereits eine Selektion *in vivo* erfahren, was die Steigerung der Affinität der IgGs gegenüber den scFvs erklären könnte.

Durch das Einfügen von Mutationen in die Antikörpergene werden im scFv-Format möglicherweise Antikörper selektiert, die durch die Präsenz des Peptidlinkers, der V_H und V_L verbindet, stabilisiert werden. Da dieser Peptidlinker im IgG gegenüber den Fusionsantikörpern scFv-Fc oder scIgG fehlt, haben die Fusionsantikörper, aber nicht zwingend die IgGs eine stärkere Affinität zum Antigen als der nicht mutierte Parentalantikörper. Dadurch kann der Affinitätsverlust der Variante HT186-B7, sowie die fehlende Affinitätssteigerung der übrigen affinitätsgereiften Varianten, beim Formatwechsel von scFv-Fc nach IgG erklärt werden.

Die hier untersuchten scFv-Fc Fusionsantikörper bildeten neben Monomeren Dimer- und/oder Trimer-Moleküle, wodurch die apparente Bindungsstärke erhöht wurde. Eine Multimerisierung wurde für die entsprechenden IgGs, mit Ausnahme des HT186-D11 IgGs nicht nachgewiesen. Da auch der Ausgangsklon IIB6 scFv-Fc Multimere bildete, ist die fehlende Affinitätssteigerung der affinitätsgereiften Varianten durch den Formatwechsel von scFv-Fc nach IgG nicht auf eine Multimerisierung der scFv-Fcs gegenüber den IgGs zurückzuführen.

Vergleicht man die MUC1-spezifischen IgGs untereinander, so wies nur einer von drei affinitätsgereiften Antikörper eine deutlich gesteigerte Affinität gegenüber dem Parentalklon IIB6 auf. Der Vorteil der Affinitätsreifung im scFv-Format hatte sich hier durch den Formatwechsel von scFv in IgG also teilweise relativiert oder umgekehrt. Hinzu kommt, dass der Kandidat mit der höchsten Affinität Dimere bzw. Trimere bildete, was bei therapeutischen Antikörpern nicht erwünscht ist, da Antikörperaggregate potentiell immunogen sind (Hermeling et al., 2004; Jefferis, 2011; Singh, 2011). Um die Aggregation von Antikörpern zu verhindern, werden beispielsweise die FRs, die Berührungsflächen der Domänen oder die Antigenbindungsschleifen modifiziert (Perchiacca und Tessier, 2012), was wiederum andere Eigenschaften des Antikörpers wie die Antigenbindung beeinflussen kann (Lee et al., 2013).

5.2 NEUE ANTIKÖRPERFORMATE FÜR DIE ENTWICKLUNG VON IgGs

Der Vergleich der MUC1-spezifischen Antikörper als scFv-Fc und IgG war ein Hinweis auf die Ineffizienz der Affinitätsreifung im scFv-Format für die Entwicklung von IgGs. Für eine Affinitätsreifung *in vitro* sind die gegenüber den vollständigen Antikörperformaten weniger komplexen Antikörperfragmente essenziell, da sie von Prokaryoten wie *E. coli* in ausreichendem Maße produziert werden und sich auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentieren lassen. Allerdings stellen die Antikörperfragmente ein artifizielles Antikörperformat dar und es ist unklar, ob die Antikörper nach der Konvertierung in das IgG-Format ihre erhöhte Affinität gegenüber dem Ausgangsklon beibehalten.

Aus diesem Grund wurden neben dem scFv-Format die Antikörperformate scFab Δ C, Fab, sowie Fab Δ C für die Affinitätsreifung mittels Phagen-Display untersucht. Dazu wurden die CD30-spezifischen scFvs SH313-B5 und -F9 (Wezler et al., 2012) in die genannten Antikörperfragmente formatiert und als Antikörperphagen rekombinant in *E. coli* hergestellt.

Beide Antikörperklone wiesen als scFv-Phage sowohl die stärkste CD30-Bindung als auch die stärkste Präsentation auf der Phagenoberfläche auf. Im scFab Δ C- und Fab Δ C-Format war die Bindung an das Antigen etwa gleich stark, aber die Präsentation der Antikörper auf der Oberfläche von Bakteriophagen war kaum nachweisbar. Im Fab-Format banden die CD30-spezifischen Antikörperphagen am wenigsten stark ihr Antigen, insbesondere für SH313-F9 Fab-Antikörperphagen war die CD30-Bindung kaum nachweisbar. Grundsätzlich waren alle vier Antikörperformate der Antikörper SH313-B5 und -F9 für den Einsatz zur Affinitätsreifung mittels Phagen-Display geeignet.

Für die Affinitätsreifung von Antikörpern ist zunächst eine Diversifizierung der Antikörpergene notwendig. Das kann durch Zufallsmutagenese (Irving et al., 1996; Low et al., 1996; Martineau, 2002; Thie et al., 2009), gerichtete Mutagenese (Lewis und Lloyd, 2012), DNA-*Shuffling* (Liu et al., 2012), *Chain Shuffling* (Schier et al., 1996; Yoshinaga et al., 2008) oder Computer gestützte Designs (Lippow et al., 2007) erreicht werden.

Die Zufallsmutagenese wird durch *Error-prone*-PCR (Martineau, 2002; Thie et al., 2009) oder durch die Verwendung von speziellen *E. coli*-Mutationsstämmen (Irving et al.,

1996; Low et al., 1996) ermöglicht. Durch die Sättigungsmutagenese werden nahezu alle möglichen Mutationen in beschränkte Bereiche wie den CDRs eingefügt (Yang et al., 1995). Mit gerichteten Mutagenesen, wie beispielsweise der ortsspezifischen Mutagenese (Lewis und Lloyd, 2012) oder andere Mutagenesearten wie dem Alaninscanning (Kawa et al., 2011) oder der *Look-Through*-Mutagenese (Rajpal et al., 2005) werden begrenzte Anzahlen von Mutanten generiert. Außerdem existieren viele *Shuffling*-Methoden, wie etwa *DNA-Shuffling* (Jermutus et al., 2001; Liu et al., 2012; Rani et al., 2012; Stemmer, 1994a), *Chain Shuffling* (Marks, 2004; Schier et al., 1996; Yoshinaga et al., 2008) oder *CDR-Shuffling* (Kobayashi et al., 2010; Marks et al., 1992) um neu kombinierte Antikörpervarianten zu erhalten. Die so erstellten Antikörpergenbibliotheken müssen in einem Selektionsprozess mittels Phagen- (Colwill et al., 2011; Dübel et al., 2010; Hust et al., 2011; Vaughan et al., 1996), Ribosomen- (Hanes et al., 1998; Zhao et al., 2009), Hefe- (Siegel, 2009; Wang et al., 2007), mRNA- (Fukuda et al., 2006) oder *E. coli*-Display (Daugherty et al., 1998) nach Antikörpern mit erhöhter Affinität gegenüber dem Parentalklon gescreent werden.

Hier wurden drei aufeinander folgende *Nested-Error-Prone*-PCRs durchgeführt. Damit wurden Mutationen über den gesamten Bereich der Gene der variablen Domänen zugelassen. Nach drei aufeinander folgenden *Error-prone*-PCRs wurden durchschnittlich zwölf (SH313-B5) bzw. 14 (SH313-F9) zufällige Punktmutationen in die Antikörpergene eingefügt, was zu durchschnittlich acht AS-Substitutionen führte. Aus anti-Digoxin-scFv-Mutationsbibliotheken mit unterschiedlichen Mutationsraten (1,7; 3,8 und 22,5 Mutationen pro scFv-Gen) wurden aus den Antikörpergenbibliotheken mit 3,8 und 22,5 Mutationen pro scFv-Gen Antikörperklone mit den höchsten Affinitäten selektiert (Daugherty et al., 2000).

Mit den mutierten Antikörpergenen wurden scFv-, scFab Δ C-, Fab- und Fab Δ C-Mutationsbibliotheken von 2×10^6 - 6×10^7 cfu erstellt. Damit war die theoretische Komplexität im Vergleich zu andere Mutationsbibliotheken, die für die Affinitätsreifung eines anti-c-erbB-2-scFvs ($1-2 \times 10^6$ cfu) (Schier et al., 1996), eines anti-Digoxin-scFvs ($0,1-1,4 \times 10^5$ cfu) (Daugherty et al., 2000), zweier anti-carcinoembryonic-antigen (CEA)-scFvs ($1,0 \times 10^6$ bzw. $2,5 \times 10^6$ cfu) (Graff et al., 2004; Pavoni et al., 2006) verwendet wurden, hoch. Ein weiterer Aspekt für die Qualität der Mutationsbibliotheken stellt der Anteil der vollständig enthaltenen Antikörperfragmente dar. Für die in dieser Arbeit erstellten Mutationsbibliotheken lag der Anteil an vollständigen enthaltenden Antikörpergenen bei 73-100%. Eine

Ausnahme stellte die SH313-B5 scFv-Mutationsbibliothek dar, deren Anteil an vollständigen enthaltenden Antikörpergenen mit 56% deutlich unter den übrigen Mutationsbibliotheken lag. Hohe theoretische Komplexitäten mutierter scFv-Bibliotheken sind beispielsweise für anti-CRP scFvs ($1,2 \times 10^7$ - $2,5 \times 10^7$ cfu) (Fröde, 2012) oder anti-MUC1-scFvs ($7,4 \times 10^7$ - $1,8 \times 10^8$ cfu) (Thie, 2008) angegeben, allerdings ist der Anteil vollständiger scFv-Gene mit 25-56% geringer als bei den hier erstellten Bibliotheken mit Ausnahme der SH313-B5 scFv-Mutationsbibliothek.

Für die mit Hyperphage verpackten, mutierten Antikörpergenbibliotheken war die Präsentation auf der Phagenoberfläche eindeutige nachweisbar. Dies konnte für die mit M13K07 verpackten Antikörpergenbibliothek nicht gezeigt werden, was sich auf das bei der Verwendung von M13K07 monovalenten gegenüber dem bei Hyperphage polyvalenten Antikörperdisplay zurückführen lässt (Rondot et al., 2001).

In den Antikörperformaten scFv und scFab Δ C wurden mehr affinitätsgesteigerte Kandidaten identifiziert als in den Formaten Fab bzw. Fab Δ C. Das könnte zum einen an einer verringerten CD30-Bindung oder an geringeren Produktionsausbeuten der Antikörper in Fab und Fab Δ C gegenüber scFv und scFab Δ C liegen, was wiederum auf das zweikettige Format des Fab bzw. Fab Δ C gegenüber den scFv und scFab Δ C zurückzuführen sein könnte. Die Produktion von Fabs in *E. coli* wird auch in anderen Studien als schwierig beschrieben (Kuba et al., 2008). Eine Optimierung der Parameter wie Produktionsdauer und Medium bei einer Produktionstemperatur von 25°C führte zwar zu einer Ausbeutesteigerung identifizierter Fab Δ C-Kandidaten, dennoch war keine CD30-Bindung der Ausgangsantikörper im Fab- bzw. Fab Δ C-Format detektierbar. Zudem zeigte sich, dass die optimalen Produktionsbedingungen auch vom Antikörperklon abhängen. Die Produktion ohne die Induktion der Expression mit IPTG führte im Gegensatz zu einer anderen Studie (Kuba et al., 2008) nicht zu einer Ausbeutesteigerung von Fabs.

Es wurden keine affinitätsgereiften Kandidaten des SH313-F9 im Fab-Format identifiziert. Bereits der SH313-F9 Fab-Phage wies eine gegenüber den anderen Formaten geringe CD30-Bindung auf. Durch die Deletion der C-terminalen Cysteine, die normalerweise die Disulfidbrücke zwischen C_L und C_{H1} bilden, konnte die CD30-Bindung der so entstandenen SH313-F9 Fab Δ C-Phagen verbessert werden. Dieser Effekt wurde ebenfalls, wenn auch im geringeren Maße, für den Antikörper SH313-B5 beobachtet. Auch das scFab Δ C-Format weist durch die Deletion der C-terminalen Cysteine eine gesteigerte prokaryotische Expression sowie eine stärkere Präsentation

von Antikörpern auf der Oberfläche von Phagen auf (Hust et al., 2007b). In anderen Studien haben ungepaarte Cysteine in Antikörperfragmenten einen negativen Einfluss auf die Produktion in Prokaryoten (Schmiedl et al., 2000).

Die Gene der affinitätsgereifter Antikörperfragmente waren sequenzunterschiedlich. Dies spricht zum einen für die hohe Diversität der Antikörpergenbibliotheken, zum anderen für die verwendete Panningstrategie, in der auf eine Amplifikation der eluierten Phagen für den Einsatz in einer weiteren Panningrunde verzichtet wurde. Mit durchschnittlich vier ausgetauschten Aminosäuren lag die Anzahl substituierter Aminosäuren in den affinitätsgereiften Antikörpern unterhalb der durchschnittlichen Mutationsrate der Antikörpergenbibliotheken. Das lässt die Vermutung zu, dass geringere Mutationsraten in den Antikörpergenbibliotheken ausreichend gewesen wären. So kann bereits der Austausch einer einzelnen Aminosäure einen Effekt auf die Konformation (Holmes et al., 2001; Krauss et al., 2004) oder die Affinität (Irving et al., 1996; Kobayashi et al., 2010; Nakanishi et al., 2013) eines Antikörpers haben. Andererseits wurden bei der Affinitätsreifung eines MUC1-spezifischen Antikörpers durchschnittlich acht Aminosäuresubstitutionen gefunden (Thie, 2008), allerdings war die Mutationsrate der Antikörpergenbibliothek mit 20-30 Punktmutationen pro scFv-Gen ebenfalls höher als die in der vorliegenden Arbeit. Antikörper aus mutierten Antikörpergenbibliotheken zur Affinitätsreifung zweier CRP-spezifischer scFvs wiesen durchschnittlich neun Aminosäuresubstitutionen auf, durch die Phagen-Display Selektion wurden höher affine Antikörper mit durchschnittlich 4,5 Aminosäureaustauschen gefunden (Fröde, 2012). Wie bereits erwähnt wurde aus anti-Digoxin-scFv-Mutationsbibliotheken mit unterschiedlichen Mutationsraten (1,7; 3,8 und 22,5 Mutationen pro scFv-Gen) aus den Antikörpergenbibliotheken mit 3,8 und 22,5 Mutationen pro scFv-Gen Antikörperklone mit den höchsten Affinitäten selektiert (Daugherty et al., 2000). Die für die Affinitätsreifung optimale Anzahl an Mutationen in den Antikörpergenbibliotheken ist also abhängig vom Antikörperklon.

Durch den Sequenzvergleich selektierter CD30-Binder wurden Mutations-*hot-spots* identifiziert. In 14 von 15 Kandidaten wurde eine Mutation in V_L-FR1 von SH313-B5 gefunden, die zu einem Austausch der dritten Aminosäure führte. Die erste Aminosäure in V_H-CDR3 des SH313-F9s war in elf von 21 Antikörpern verändert. Dagegen waren einige Bereiche der Antikörper nicht von AS-Substitutionen betroffen, wie etwa CDR1 und -2 von SH313-B5 Mutanten und FR2 und -4 von SH313-F9 Mutanten innerhalb der V_H der Fall. Ebenso traten bei den Mutanten beider

Parentalklone keine AS-Substitutionen in CDR2 und FR4 der V_L auf. Allerdings reduzierte die verhältnismäßig geringe Anzahl von drei AS der V_L -CDR2 beider Parentalklone die Wahrscheinlichkeit einer Mutation in diesem Bereich. Im Gegensatz dazu wurden gehäuft AS-Substitutionen in der V_L -CDR2 von affinitätsgereiften, MUC1-spezifischen scFvs gefunden, obwohl diese Region auch hier nur drei AS umfasste (Thie et al., 2011). Die Regionen, in denen keine Mutationen selektiert wurden scheinen also nicht wesentlich für eine Steigerung der Affinitäten der untersuchten CD30-spezifischen Antikörper beizutragen. Die Substitution der dritten AS von SH313-F9 VL-FR3 tritt in allen im Fab Δ C-Format affinitätsgereiften Antikörper auf, ist also formatabhängig.

Das Auftreten von Mutations-*hot-spots* in den FR-Regionen spricht für die Methode der Zufallsmutagenese über den gesamten Bereich der variablen Domänen der Antikörper, da sie wahrscheinlich für die Affinitätsreifung dieser Antikörper von Bedeutung sind. Durch Mutagenesemethoden, die sich auf Bereiche, wie etwa die CDRs beschränken (Yang et al., 1995; Lewis und Lloyd, 2012), wären die anscheinend wichtigen AS-Substitutionen in den FR-Regionen nicht aufgetreten.

Der Antikörper SH313-F9 und affinitätsgereifte Varianten wurden in die Formate IgG, und abhängig vom ursprünglichen Antikörperformat in scFv-Fc (nur scFvs) und scIgG (nur scFab Δ C) konvertiert. Während affinitätsgereifte Kandidaten in den Formaten scFv-Fcs und scIgGs verglichen mit dem SH313-F9 im entsprechenden Format eine stärkere oder zumindest ähnliche CD30-Bindung aufwiesen, war die CD30-Bindung der dazugehörigen IgGs verglichen mit dem SH313-F9 IgG in keinem Fall erhöht. Das bedeutet, dass die hier in den Formaten scFv und scFab Δ C affinitätsgereiften Kandidaten durch die Konvertierung in das IgG-Format Affinität gegenüber dem SH313-F9 verlieren. Dieser Effekt machte hier wiederum die Affinitätsreifung in den Formaten scFv und scFab Δ C unwirksam, wenn das Zielformat ein IgG wäre. Im Gegensatz dazu wiesen die im Fab Δ C-Format affinitätsgereiften Antikörperklone MiS196-D5, MiS203-C1 und -C9 auch als IgGs eine stärkere Bindung an rekombinantes CD30 sowie an natives CD30 auf der Oberfläche von CD30⁺ Lymphomzellen im Vergleich zum Parentalklon SH313-F9 IgG auf.

Das Antikörperformat scFab Δ C besitzt im Unterschied zum Fab Δ C einen Peptidlinker, der die leichte Kette mit dem Fd-Fragment verbindet. Durch eine Affinitätsreifung im scFab Δ C-Format könnten Strukturen bevorzugt werden, welche die Anordnung von LC und Fd-Fragment in Anwesenheit des Peptidlinkers stabilisieren. Durch die mit den

Formatwechsel in das IgG-Format verbundene Abwesenheit des Peptidlinkers könnten die Vorteile dieser Mutationen wieder verloren gehen. Dies könnte erklären, warum hier die affinitätsgereiften scFab Δ Cs im Gegensatz zu Fab Δ Cs bei der Konvertierung in das IgG-Format Affinität verlieren. Die Affinitätsreifung im scFv-Format ist der Situation im scFab Δ C-Format vergleichbar.

Die Affinität des Antikörpers MiS203-C9 IgG war im Vergleich zum SH313-F9 IgG um den Faktor 12 von 159 nM auf 13 nM verstärkt worden, der Antikörper MiS203-C1 IgG hatte eine um den Faktor 8 und der Antikörper MiS196-D5 IgG eine um den Faktor 11 gesteigerte Affinität gegenüber dem SH313-F9 IgG. Andere Gruppen beschreiben eine drei- bis über 100-fach gesteigerte Affinität durch Mutagenese der CDRs oder der V-Gene (Irving et al., 1996; Low et al., 1996; Phumyen et al., 2012), allerdings bezieht sich hier die Affinitätssteigerung auf die Antikörperfragmente, in denen die Affinitätsreifung stattfand. Durch die Konversion in das IgG-Format kann es, wie es in der vorliegenden Arbeit und anderen Arbeiten (Thie et al., 2011) gezeigt wurde, zu Einbußen in der zuvor gesteigerten Affinität kommen. Meistens wird die Affinität nach der Konversion in das IgG-Format nicht gemessen (Huls et al., 1999; Liu et al., 2007), oder apparente Effekte durch die Avidität werden nicht berücksichtigt (Xie et al., 1997). Höhere Aviditäten können, wie durch den Wechsel eines monovalenten in ein bivalentes Format hervorgerufen, zu einen hundertfachen Anstieg der Antigenbindung führen (Nowakowski et al., 2002; Pohl et al., 2012).

Interessanterweise kam es bei der Konvertierung des Parentalklons SH313-F9 scFvs, wie schon für den scFv IIB6 beschrieben, in das IgG-Format nicht zu einem Verlust der Affinität. Vergleicht man den SH313-F9 im scFv-Fc- und IgG-Format, so besitzt der IgG eine um den Faktor 2,5 gesteigerte Affinität. Der Antikörperklon SH313-F9 wurde aus der naiven Antikörpergenbibliothek HAL7 isoliert. Da die Antikörpergene der HAL7 Bibliothek aus peripheren B-Lymphozyten isoliert wurden, wurden die dazugehörigen Antikörper wie schon in den oben beschriebenen Bibliotheken, aus denen der IIB6 scFv (Tolakis, 2004) bzw. BoNT-A-spezifische scFvs (Nowakowski et al., 2002) isoliert wurden, hinsichtlich ihrer Funktionalität als B-Zellrezeptoren und als Antikörper in natürlich vorkommenden Formaten *in vivo* bereits selektiert. Erst durch Mutationen und Selektion in IgG strukturell unterschiedlichen Formaten (scFv, scFab Δ C), werden Mutationen bevorzugt, die sich wahrscheinlich nicht positiv auf die Affinität im IgG-Format auswirken. Möglicherweise kommt es durch die Selektion aus mutierten Antikörpergenbibliotheken im scFv- oder scFab Δ C-Format zu einer Beeinflussung, der

die Selektion von Antikörperfragmenten, die eine gesteigerte Affinität als IgG besitzen erschwert. Dies ist auch bei der Verwendung des Antikörperfragments Fab denkbar, da ein erhöhte Selektionsdruck durch die erschwerte bakterielle Produktion gegenüber Fab Δ Cs zu erwarten ist. Beispielsweise ist die bakterielle Produktion eines affinitätsgereiften anti-Arsenat Fabs gegenüber dem parentalen Fab stark eingeschränkt (Gill et al., 1997).

Die Affinitätsreifung des Antikörper SH313-F9 mittels Phagen-Display war für das Zielformat IgG abhängig vom verwendeten Antikörperformat. Während affinitätsgereifte Fab Δ Cs auch erhöhte Affinitäten im IgG-Format aufwiesen, konnte dies für die einkettigen Formate scFv und scFab Δ C nicht gezeigt werden. Für die Affinitätsreifung des SH313-F9 im Fab-Format konnten keine affinitätsgereiften Kandidaten identifiziert werden. Dieser Effekt sollte in Zukunft für weitere Antikörperklone überprüft werden, insbesondere wäre dann ein Vergleich der Affinitätsreifung zwischen den Formaten Fab und Fab Δ C interessant.

5.3 KOMBINATION UNTERSCHIEDLICHER IgG-KETTEN

AFFINITÄTSGESTEIGERTER ANTIKÖRPER

Beim *Chain Shuffling* kommt es zu einer Neukombination der schweren und / oder leichten Ketten von Antikörpern, wodurch sich eine Affinitätsreifung durchführen lässt (Marks et al., 1992; Marks, 2004; Yoshinaga et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden die schweren oder leichten IgG-Ketten affinitätsgesteigerter Antikörper mit den dazugehörigen Ketten des Parentalklons SH313-F9 kombiniert. Diese neu kombinierten IgGs wurden bezüglich ihrer CD30-Bindung verglichen. Dabei zeigte sich, dass sämtliche leichte Ketten affinitätsgereifter Fab Δ Cs maßgeblich zu gesteigerten Affinitäten führten. Im Vergleich zu den IgGs, in denen beide variablen Domänen aus einem affinitätsgereiften Fab Δ C stammten, wiesen die IgGs mit affinitätsgereiften V_LS aber eine schwächere CD30-Bindung auf. Das zeigt, dass die AS-Substitutionen, die in den V_HS der im Fab Δ C-Format affinitätsgereiften Antikörper erst in Kombination der dazugehörigen V_L zu gesteigerten Affinitäten führten. Da die Affinitätsreifung beider variabler Domänen parallel verlief, ist es möglich, dass erst die Kombination unterschiedlicher AS-Substitutionen in beiden IgG-Ketten einen synergetischen Effekt auf die Affinität des Antikörpers hatte.

Die affinitätsgereiften Fab Δ Cs besaßen vier oder fünf AS-Substitutionen, von denen der Austausch der dritten AS von V_L-FR3 in die gleiche AS gemeinsam war. Die Tatsache, dass die neu kombinierten IgGs mit dieser neuen AS eine gesteigerte CD30-Bindung aufwiesen, bekräftigt die Vermutung, dass diese AS maßgeblich für die Affinitätssteigerung der Antikörper zuständig war, obwohl sich die physikochemischen Eigenschaften der AS nicht wesentlich änderten, da eine große/hydrophobe in eine kleine/ambiphile Aminosäure (Pommié et al., 2004) ausgetauscht wurde.

5.4 AFFINITÄTSREIFUNG VON ANTIKÖRPERN MITTELS DNA-SHUFFLING

Die Methode des DNA-*Shufflings* ermöglicht die homologe Rekombination eines Genpools aus zuvor selektierten Mutanten durch eine zufällige DNA-Fragmentierung und einen PCR basierten Wiederausammenbau der Gene *in vitro* (Stemmer, 1994a, 1994b). Damit wird im Gegensatz zum *Chain Shuffling* die Neukombination von Punktmutationen auf einer variablen Domäne ermöglicht, was bereits erfolgreich für die Optimierung zahlreicher Proteine wie Antikörper (Liu et al., 2012; Rani et al., 2012; Zhou et al., 2013), Antigene (Zhou et al., 2013), verschiedener Enzyme (Akbulut et al., 2013; Jia et al., 2012; Stemmer, 1994a; Wang et al., 2013) und Vakzine (Locher et al., 2005; Whalen et al., 2001), aber auch bei genetischen Elementen wie Promotoren (Werkman et al., 2011) eingesetzt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene affinitätsgereifter Varianten des SH313-F9 mittels DNA-*Shuffling* neu kombiniert. Die dafür ausgewählten Antikörper stammten aus der Affinitätsreifung in den Formaten scFv, scFab Δ C, sowie Fab Δ C und werden im folgenden als Antikörper der ersten Generation bezeichnet. Die Selektion der neu kombinierten Antikörper (Antikörper der zweiten Generation) fand ausschließlich im Fab Δ C-Format statt, da vorher gezeigt wurde, dass affinitätsgesteigerte Fab Δ Cs zu affineren IgGs konvertiert werden konnten. Die erzeugte Antikörpergenbibliothek hatte eine theoretischen Komplexität von 3×10^7 cfu und besaß einen Anteil vollständiger Fab Δ C-Genen von 100% vor bzw. 91% nach der Verpackung mit M13K07.

Durch eine Kompetition mit löslichen CD30-hFc während des Pannings sollte der Selektionsdruck auf Antikörperphagen mit verlangsamter Dissoziation erhöht werden, da dadurch eine erneute Assoziation von bereits dissoziierten Antikörperphagen erschwert werden sollte. Es zeigte sich, dass durch steigende CD30-Konzentrationen zur Kompetition die Menge eluierter Phagen proportional abnahm. Bei der Kompetition mit 86 μ g CD30-hFc war die Menge eluierter Phagen um den Faktor sieben reduziert, wodurch sich bei gleicher Anzahl an analysierten Antikörperklonen theoretisch die Wahrscheinlichkeit erhöht, Antikörper mit gesteigerter Affinität zu selektieren. Dies spiegelte sich allerdings weder in der Anzahl noch in der Antigenbindungsstärke selektierter Fab Δ Cs aus Pannings mit unterschiedlichen CD30-Mengen zur Kompetition wieder.

Im Vergleich zu den affinitätsgereiften Fab Δ Cs aus der ersten Generation wiesen Antikörperklone aus der zweiten Generation eine stärkere CD30-Bindung auf.

Die Sequenzanalyse von 26 selektierten Antikörperklonen ergab, dass alle Kandidaten eine unterschiedliche Sequenz besaßen, allerdings gab es mehrere V_Ls, die bis zu fünfmal in 26 Antikörperklonen vor kamen. Es setzten sich nicht alle Mutationen durch, die in den für die Konstruktion der neu kombinierten Antikörpergenbibliotheken verwendeten Antikörpergenen enthalten waren. Doppelt so viele AS-Substitutionen der V_L gegenüber der V_H aus der ersten Generation wurden nicht in den analysierten Antikörperklonen der zweiten Generation wiedergefunden. Dabei stammten AS-Substitutionen, die sich nicht durchgesetzt haben, gleichermaßen aus den drei verwendeten Formaten scFv, scFab Δ C und Fab Δ C. Andererseits handelte es sich bei 15% der beobachteten AS-Substitutionen um neue Substitutionen, die nicht in den Antikörpern vorlagen, deren Gene als Matrize zur Konstruktion der neu kombinierten Bibliotheken eingesetzt wurden. Der überwiegende Anteil dieser neu aufgetretenen AS-Substitutionen (28 von 33) befand sich dabei in V_H. Das Auftreten von neuen AS-Substitutionen kann unter anderen durch die Verwendung einer Taq-Polymerase während des Wiedezusammenbaus und der Amplifikation der Antikörpergene begründet sein. Zudem ist denkbar, dass es bei Wiedezusammenbau der DNA durch die Punktmutationen zu Fehlpaarungen gekommen war. Möglicherweise haben diese neuen AS-Substitutionen in der V_H einen größeren Selektionsvorteil gegenüber neuen AS-Substitutionen in V_L erfahren. Betrachtet man die geringe Anzahl an neuen AS-Substitutionen in V_L zusammen mit dem mehrfachen Auftreten einiger V_Ls so scheint es, als ob die Affinitätsreifung der V_L weiter fortgeschritten war, als die Affinitätsreifung der V_Hs.

Insgesamt wurde die Anzahl an AS-Substitutionen verglichen mit denen als DNA-Matrizen eingesetzten Antikörperklonen von durchschnittlich 4,1 auf 7,3 Substitutionen je Antikörperklon erhöht, davon waren nun 4,5 (zuvor 2,4) Substitutionen in V_H und 2,8 (zuvor 1,8) Substitutionen in V_L pro Antikörperklon enthalten. Die schon in der ersten Antikörpergeneration aufgetretenen Mutations-*hot-spots* setzten sich in der zweiten Generation durch: So führten Mutationen zu einer Substitution der ersten Aminosäure in V_H-CDR3 in jedem einzelnen der analysierten Antikörper, die Substitution der Aminosäure an Position drei von V_L-FR3, die besonders bei Antikörpern im Fab Δ C-Format aus der ersten Generation auftrat, wurde in 25 von 26 Antikörpern der zweiten Generation wieder gefunden.

Im Vergleich zum SH313-F9 IgG banden alle drei IgGs aus der zweiten Generation stärker an rekombinantes sowie natives CD30. Die Affinität des MiS381-A9 IgG war gegenüber dem SH313-F9 IgG mit einem Faktor 26 auf 6 nM am stärksten gesteigert. Die beiden anderen IgGs der zweiten Generation wiesen eine um den Faktor 13 (MiS379-B6) bzw. 14 (MiS382-F4) gesteigerte Affinität im Vergleich zum SH313-F9 IgG auf. Die IgGs der zweiten Generation wiesen damit auch stärkere Affinitäten als der beste Kandidat der ersten Generation (MiS203-C9 IgG) auf. Eine erhöhte apparente Affinität der IgGs durch Multimerisierung wurde nicht beobachtet. Durch die erfolgreiche Konvertierung von mittels DNA-*Shuffling* generierten Fab Δ Cs in das IgG-Format wurde die Eignung des Fab Δ C-Formats für die Affinitätsreifung von IgGs bestätigt.

Die Affinität des scFvs CWP2, der spezifisch für ein Zellwand gebundenes Protein von *Fusarium graminearum* ist, wurde durch DNA-*Shuffling* und anschließender Selektion mittels Phagedisplay um den Faktor 7-15 gesteigert (Liu et al., 2012). Die Affinität des scFvs 80R, der spezifisch für das Schwere Akute Respirations Syndrom verursachende Coronavirus (engl.: *severe acute respiratory syndrome coronavirus*, SARS-CoV) ist, wurde durch DNA-*Shuffling* und anschließender Selektion mittels Bakteriendisplay um den Faktor 270 gesteigert (Rani et al., 2012). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit werden die Affinitäten der verbesserten CWP2- und 80R-Varianten im scFv-Format verglichen. Durch die Konversion von affinitätsgesteigerten scFvs in das IgG-Format kann es allerdings zu einem Affinitätsverlust kommen (Thie et al., 2011).

Zwei der drei IgGs der zweiten Generation (MiS379-B6, MiS382-F4) wiesen neben der höheren Affinität auch eine höhere Temperaturstabilität gegenüber dem Parentalklon SH313-F9 IgG und den IgGs aus der ersten Generation auf. Die Antikörper mit erhöhter Temperaturstabilität wiesen keine gemeinsame AS-Substitution auf, die in den anderen Antikörpern nicht enthalten war.

Ein Austausch von Aminosäuren kann unterschiedliche Auswirkung bezüglich Affinität und Stabilität von Antikörpern haben. Eine höhere Temperaturstabilität kann durch eine Stabilisierung der Antikörperstruktur erreicht werden, die dazu führt, dass beispielsweise die CDRs, die für die Antigenbindung zuständig sind, weniger flexibel sind (Clark et al., 2013.). Diese geringere Flexibilität kann wiederum die freie Bindungsenergie durch einen günstigeren Beitrag der Entropie positiv beeinflussen. Damit sind gleichzeitig die Stabilität und die Affinität des Antikörpers erhöht, auf die letztere Eigenschaft wird durch das hier durchgeführte Panning selektiert. Der

Austausch von kanonischen Aminosäuren des VLA1-spezifischer Antikörper AQC2 konnte ebenfalls gleichzeitig Affinität und Stabilität erhöht werden (Clark et al., 2013). AS-Austausche an der Berührungsfläche zwischen V_H und V_L führten in einer scFv-Toxin-Fusion ebenfalls zu einer gleichzeitigen Steigerung der Affinität und Stabilität (McHugh et al., 2002). Im Gegensatz dazu wurden in dem *in vivo* affinitätsgereiften Antikörper 48G7 Mutationen identifiziert, die entweder die Stabilität oder die Affinität beeinflussten (Sun et al., 2013).

5.5 FAZIT

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Antikörperformat, welches zur Affinitätsreifung mittels Phagen-Display verwendet wird, einen Einfluss auf die Affinität des Antikörpers im IgG-Format hat. Durch den Vergleich von im scFv-Format affinitätsgereiften MUC1-spezifischen Antikörpern in verschiedenen IgG-(ähnlichen)-Formaten stellte sich heraus, dass affinitätsgereifte Kandidaten im IgG-Format nicht immer eine erhöhte Affinität gegenüber dem Ausgangsantikörper IIB6 IgG besaßen. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde die Affinitätsreifung des CD30-spezifischen SH313-F9 zusätzlich zum scFv-Format, in den Formaten scFab Δ C, Fab und Fab Δ C durchgeführt. IgGs mit gesteigerter Affinität wurden nur für Varianten identifiziert, die im Fab Δ C-Format affinitätsgereift wurden. Die fehlende Disulfidbrücke zwischen LC und Fd-Fragment im Fab Δ C ermöglichte gegenüber dem Fab eine verstärkte funktionale Präsentation auf der Phagenoberfläche und eine Identifizierung affinitätsgesteigerter Kandidaten. Die Affinitätsreifung im scFv- und scFab Δ C-Format führte zwar zur Selektion affinitätsgesteigerter Kandidaten in den Formaten scFv-Fc und sclgG, aber nicht zu affinitätsgesteigerten IgGs.

Durch *DNA-Shuffling* wurden weitere affinitätsgereifte Fab Δ Cs identifiziert, deren gesteigerte Affinität im IgG-Format die zuvor generierten IgGs noch übertraf. Dadurch wurde die Eignung des Fab Δ C-Formats für die Affinitätsreifung mittels Phagen-Display validiert.

6 AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurden effiziente Strategien für die Affinitätsreifung von therapeutischen IgGs erarbeitet. Die Problematik, dass affinitätsgereifte Antikörperfragmente nicht zwingend IgGs mit erhöhter Affinität gegenüber dem Parentalantikörper sind, wurde hier an mehreren Beispielen belegt. Für die weitere Abklärung des Einflusses des Antikörperformats auf die Phagen-Display basierte Affinitätsreifung von IgGs müssen weitere Antikörper entsprechend den in dieser Arbeit genutzten Strategien untersucht werden, um eine allgemeine Aussage zu treffen. So sollten weitere Antikörper vor allem in den Formaten Fab und Fab Δ C parallel affinitätsgereift werden, Kandidaten mittels Phagen-Display Selektion identifiziert und im IgG-Format verglichen werden. Damit sollte überprüft werden, inwieweit sich die Vorteile des Formats Fab Δ C gegenüber Fab auf weitere Antikörper übertragen lassen. Darüber hinaus wäre interessant, ob man für den jeweiligen Antikörper ähnliche AS-Substitutionen in beiden Formaten selektiert, oder ob die zu erwartende erschwerte bakterielle Produktion von Fabs gegenüber Fab Δ Cs zu anderen AS-Substitutionen führt. Das DNA-*Shuffling* wurde hier erfolgreich im Fab Δ C-Format angewendet, um bereits affinitätsgesteigerte Antikörperkandidaten so miteinander zu kombinieren, dass man IgGs mit weiter erhöhten Affinitäten erhielte.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	anti
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
2×YT	2×Yeast-Tryptone-Medium
2×YT-GA	2×Yeast-Tryptone-Medium mit Glukose und Ampicillin
2×YT-SA	2×Yeast-Tryptone-Medium mit Saccharose und Ampicillin
2×YT-T	2×Yeast-Tryptone-Medium mit Tetrazyklin
A	Ampicillin
ADCC	<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i>
AG	Arbeitsgruppe
ALCL	<i>Anaplastic Large Cell Lymphoma</i>
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATL	Adultes T-Zell Lymphom
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
<i>bla</i>	β -Lactamase-Gen
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD30ex	extrazellulärer Teil des Antigens CD30
CDC	<i>Complement Dependent Cytotoxicity</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
cfu	<i>colony forming unit</i>
C_H	konstante Domäne der schweren Antikörper-Kette
CIP	Alkaline Phosphatase (<i>calf intestinal phosphatase</i>)
C_L	konstante Domäne der leichten Antikörper-Kette
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMF	N,N-Dimethylformamid
dNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EBV	Eppstein Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1,2-Dichlorethan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	Englisch
EtOH	Ethanol
f oder for	<i>forward</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
Fc	<i>fragment cristallizable</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fv	<i>fragment variable</i>
g	Gramm
G	Glukose
$\times g$	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde (<i>hour</i>)
HAL	<i>human antibody library</i>
H	<i>Heavy</i>
HEK	<i>Human Embryonal Kidney</i>
hFc	Humaner Fc-Teil
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HZI	Helmholz-Zentrum für Infektionsforschung
Ig	Immunglobulin
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
k_{on}	Assoziationsrate
kb	Kilobasenpaar
k_{off}	Dissoziationsrate
K_D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
L	Liter
L	<i>Light</i>
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
M	Stoffmengenkonzentration (Molarität); hier auch mol/L
mA	Milliampere
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm

7 Abkürzungsverzeichnis

mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar; mmol/L
MMAE	Monomethyl Auristatin E
mind.	mindestens
min	Minute
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar; μmol/L
mRNA	messenger RNA
M-PBS-T	PBST mit Milchpulver
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Molekülmasse (<i>molecular weight</i>)
nb	Nicht bestimmt
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF-κB	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer'</i> (Transkriptionsfaktor)
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei λ = 600 nm
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween-20 (<i>phosphate buffered saline Tween-20</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEI	Polyethylenimin
<i>pelB</i>	Signalpeptidsequenz zum Transport des Proteins in das Periplasma
pfu	<i>plaque forming unit</i>
pHAL14	Phagemid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r oder rev	<i>reverse</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	Zellkultumedium, am Roswell Park Memorial Institute entwickelt
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Resonance Units</i>

s	Sekunde
sCD30	<i>soluble</i> CD30
scFv	<i>single chain Fv</i>
scFv-Fc	<i>single chain Fragment variable Fragment crystallisable fusion</i>
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
ssDNA	<i>Single stranded DNA</i>
SV40	Simianes Virus 40
T	Temperatur
T	Tween
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tet	Tetrazyklin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF(R)	<i>Tumor Necrosis Factor (Receptor)</i>
TNFRSF	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily</i>
Tris	C,C,C-Tris(hydroxymethyl)aminomethan (auch Trometamol)
ü. N.	über Nacht
U	Unit
ÜNK	Übernacht-Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
V _H	variable Domäne der schweren Antikörper-Kette
V _L	variable Domäne der leichten Antikörper-Kette
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
z. B.	zum Beispiel

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.....	4
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung einiger Antikörperfragmente.....	5
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des M13-Bakteriophagen.....	13
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung eines M13-scFv-Phagens und der Phagemids pHAL14.....	14
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des CD30.....	16
Abbildung 4.1: Produktion und Reinigung von MUC1-spezifischen Antikörpern.....	47
Abbildung 4.2: Nachweis spezifischer MUC1-Peptid-Bindung.....	48
Abbildung 4.3: Multimerbildung MUC1-spezifischer Antikörper.....	49
Abbildung 4.4: MUC1-Peptid-Bindung von Antikörpern unterschiedlicher Aggregationsstadien.....	50
Abbildung 4.5: Nachweis von Antikörper-pIII-Fusionsprotein auf Antikörperphagen.....	53
Abbildung 4.6: Schema der verwendete Strategie zur Affinitätsreifung von IgGs	54
Abbildung 4.7: Übersicht über verwendete Vektoren und Antikörperfragmente.....	55
Abbildung 4.8: Error-prone-PCR von scFv-Genen mittels Mutazyme II.....	57
Abbildung 4.9: Nachweis von Antikörper-pIII-Fusionsprotein.....	58
Abbildung 4.10: Identifizierung von CD30-spezifischen SH313-F9 Varianten.....	59
Abbildung 4.11: Zeitabhängige Fab- bzw. Fab Δ C-Produktion.....	60
Abbildung 4.12: Vergleich der Antigenbindung von CD30-spezifischen Antikörperfragmenten.....	61
Abbildung 4.13: Vergleich der AS-Sequenzen im Linker selektierte scFvs.....	62
Abbildung 4.14: Vergleich der Aminosäuresequenzen affinitätsgesteigerter SH313-B5 Varianten.....	63
Abbildung 4.15: Vergleich der Aminosäuresequenzen affinitätsgesteigerter SH313-F9 Varianten.....	64
Abbildung 4.16: Vergleich der Bindung des SH313-F9 in den Formaten IgG, scFv-Fc und sclgG.....	67
Abbildung 4.17: Bindung von α -CD30 Antikörpern an rekombinantes CD30.....	68
Abbildung 4.18: Bindung CD30-spezifischer Antikörpern an Karpas299-Zellen.....	69
Abbildung 4.19: IgG-Affinitätsranking mittels SPR.....	73
Abbildung 4.20: Bindungsstudien affinitätsgesteigerter IgGs.....	75
Abbildung 4.21: Analyse von Bindungskinetiken von affinitätsgereiften IgG mittels SPR	76
Abbildung 4.22: Aggregationsverhalten von α -CD30 IgGs, scFv-Fc und sclgG.....	78
Abbildung 4.23: Bindung von Antikörper unterschiedlicher Aggregationsstadien an CD30.....	78
Abbildung 4.24: Bindung von CD30-spezifischen Antikörpern mit neu kombinierten IgG-Ketten an rekombinantes CD30.....	81
Abbildung 4.25: Bindung CD30-spezifischen Antikörpern an Karpas299-Zellen.....	82
Abbildung 4.26: DNA-Shuffling des SH313-F9 Antikörpers.....	86
Abbildung 4.27: Einfluss der Kompetition durch CD30-hFc auf die Elution von Antikörperphagen aus neu kombinierten SH313-F9 Fab Δ C- Mutationsbibliotheken...87	87
Abbildung 4.28: Identifizierung von CD30-spezifischen neu kombinierten Fab Δ Cs aus dem Panning mit CD30-hFc-Kompetition.....	88
Abbildung 4.29: Vergleich der Antigenbindung von CD30-spezifischen Fab Δ Cs.....	89
Abbildung 4.30: AS-Sequenzvergleich von CD30-spezifischen Fab Δ Cs aus neu kombinierten Antikörpergenbibliotheken.....	92

Abbildung 4.31: Bindungsstudien affinitätsgesteigerter IgGs.....	93
Abbildung 4.32: SEC-Analyse affinitätsgesteigerter IgGs aus der 2. Generation.....	94
Abbildung 4.33: Temperaturstabilität affinitätsgesteigerter IgGs.....	95
Abbildung A.1: Verwendete eukaryotische Vektoren und Antikörperformate.....	132
Abbildung A.2: Analyse von Bindungskinetiken des SH313-F9 scFv-Fcs und scIgGs...	134
Abbildung A.3: Analyse von Bindungskinetiken von IgGs.....	134

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Von der FDA zugelassene Antikörper.....	8
Tabelle 3.1: Geräte und technische Anlagen.....	19
Tabelle 3.2: Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	20
Tabelle 3.3: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	21
Tabelle 3.4: Verwendete Kits und Säulen.....	24
Tabelle 3.5: Verwendete Medien und Supplemente.....	25
Tabelle 3.6: Verwendete Bakterien, Bakteriophagen und Zelllinien.....	26
Tabelle 3.7: Verwendete Plasmide.....	26
Tabelle 3.8: Verwendete Oligonukleotide.....	27
Tabelle 3.9: Verwendete Enzyme.....	29
Tabelle 3.10: Verwendete Antigene.....	29
Tabelle 3.11: Verwendete Antikörper.....	29
Tabelle 3.12: Verwendete Standards für Proteine und DNA.....	30
Tabelle 3.13: Verwendete Software und Datenbanken.....	30
Tabelle 3.14: Zusammensetzung und Temperaturprofil von Standard-PCRs.....	31
Tabelle 3.15: Zusammensetzung und Temperaturprofil von Error-prone-PCRs.....	32
Tabelle 3.16: Zusammensetzung und Temperaturprofil von Kolonie-PCRs.....	32
Tabelle 3.17: Zusammensetzung von Restriktionsansätzen.....	34
Tabelle 3.18: Zusammensetzung von Ligationen.....	34
Tabelle 3.19: Verwendeten Zelllinien und dessen Kultivierungsbedingungen.....	39
Tabelle 4.1: Titer CD30-spezifischen Antikörperphagen.....	52
Tabelle 4.2: Anzahl von Punktmutationen und AS-Substitutionen scFv- Antikörpergenbibliotheken.....	57
Tabelle 4.3: Eigenschaften der mutagenisierten Antikörpergenbibliotheken.....	58
Tabelle 4.4: Auswahl von Antikörperklonen für die Konvertierung.....	65
Tabelle 4.5: Affinitätsranking der anti-CD30 IgGs mittels SPR.....	70
Tabelle 4.6: Proteinkonzentration gereinigter anti-CD30 Antikörper.....	74
Tabelle 4.7: Affinitäten der CD30-spezifischen Antikörper.....	77
Tabelle 4.8: Affinitäten von verschiedenen IgG-Ketten-Kombinationen.....	83
Tabelle 4.9: Eigenschaften der neu kombinierten Fab Δ C-Genbibliotheken.....	86
Tabelle 4.10: Affinitäten der IgGs (ermittelt aus SPR-Analysen).....	94
Tabelle A.1: Proteinkonzentration gereinigter anti-MUC1 Antikörper.....	131
Tabelle A.2: Proteinkonzentration gereinigter anti-CD30 Antikörper, 10 mL Produktionsmaßstab.....	131
Tabelle A.3: Proteinkonzentration gereinigter anti-CD30 Antikörper mit ausgetauschter IgG-Kette.....	133
Tabelle A.4: Auswahl von Antikörpern für die Neukombination von Mutationen.....	133

10 QUELLENVERZEICHNIS

- Adams, G.P., Schier, R., McCall, A.M., Simmons, H.H., Horak, E.M., Alpaugh, R.K., Marks, J.D., Weiner, L.M., 2001. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res.* 61, 4750-4755.
- Adams, G.P., Weiner, L.M., 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* 23, 1147-1157.
- Akbulut, N., Tuzlakoglu Öztürk, M., Pijning, T., İşsever Öztürk, S., Gümüşel, F., 2013. Improved activity and thermostability of *Bacillus pumilus* lipase by directed evolution. *J. Biotechnol.* 164, 123-129.
- Alonso-Ruiz, A., Pijoan, J.I., Ansuategui, E., Urkaregi, A., Calabozo, M., Quintana, A., 2008. Tumor necrosis factor alpha drugs in rheumatoid arthritis: systematic review and metaanalysis of efficacy and safety. *BMC Musculoskelet. Disord.* 9, 52.
- Barbas, C.F., 3rd, Kang, A.S., Lerner, R.A., Benkovic, S.J., 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7978-7982.
- Barclay, A.N., 2003. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules. *Semin. Immunol.* 15, 215-223.
- Batista, F.D., Neuberger, M.S., 1998. Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. *Immunity* 8, 751-759.
- Beckman, R.A., Weiner, L.M., Davis, H.M., 2007. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer* 109, 170-179.
- Behring, E. von, Kitasato, S., 1980. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren: aus dem Hygienischen Institut des Herrn Geheimerath Koch in Berlin; Behring Kitasato prize 1980.
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., Whitlow, M., 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426.
- Böll, B., Borchmann, P., Engert, A., 2009. Experimentelle Therapie des Hodgkin-Lymphoms. *Onkol.* 16, 48-54.
- Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I., Little, M., 1991. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104, 147-153.
- Cacia, J., Keck, R., Presta, L.G., Frenz, J., 1996. Isomerization of an aspartic acid residue in the complementarity-determining regions of a recombinant antibody to human IgE: identification and effect on binding affinity. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 1897-1903.
- Cardarelli, P.M., Moldovan-Loomis, M.-C., Preston, B., Black, A., Passmore, D., Chen, T.-H., Chen, S., Liu, J., Kuhne, M.R., Srinivasan, M., Assad, A., Witte, A., Graziano, R.F., King, D.J., 2009. In vitro and in vivo characterization of MDX-1401 for therapy of malignant lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 3376-3383.
- Carlos F. Barbas III, Dennis R. Burton, Jamie K.Scott, Gregg J. Silverman, 2004. *Phage Display: A Laboratory Manual*. CSHL Press.
- Chahboun, S., Hust, M., Liu, Y., Pelat, T., Miethe, S., Helmsing, S., Jones, R.G., Sesardic, D., Thullier, P., 2011. Isolation of a nanomolar scFv inhibiting the endopeptidase activity of botulinum toxin A, by single-round panning of an immune phage-displayed library of macaque origin. *BMC Biotechnol.* 11, 113.

- Chan, A.C., Carter, P.J., 2010. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 301–316.
- Chatenoud, L., Bluestone, J.A., 2007. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 622–632.
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Winter, G., 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624–628.
- Clark, L.A., Demarest, S.J., Eldredge, J., Jarpe, M.B., Li, Y., Simon, K., van Vlijmen, H.W.T., n.d. Influence of canonical structure determining residues on antibody affinity and stability. *J. Struct. Biol.*
- Coiffier, B., Lefretre, S., Pedersen, L.M., Gadeberg, O., Fredriksen, H., van Oers, M.H.J., Wooldridge, J., Kloczko, J., Holowiecki, J., Hellmann, A., Walewski, J., Flensburg, M., Petersen, J., Robak, T., 2008. Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study. *Blood* 111, 1094–1100.
- Colwill, K., Renewable Protein Binder Working Group, Gräslund, S., 2011. A roadmap to generate renewable protein binders to the human proteome. *Nat. Methods* 8, 551–558.
- Daugherty, P.S., Chen, G., Iverson, B.L., Georgiou, G., 2000. Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2029–2034.
- Daugherty, P.S., Chen, G., Olsen, M.J., Iverson, B.L., Georgiou, G., 1998. Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Eng.* 11, 825–832.
- De Claro, R.A., McGinn, K., Kwitkowski, V., Bullock, J., Khandelwal, A., Habtemariam, B., Ouyang, Y., Saber, H., Lee, K., Koti, K., Rothmann, M., Shapiro, M., Borrego, F., Clouse, K., Chen, X.H., Brown, J., Akinsanya, L., Kane, R., Kaminskis, E., Farrell, A., Pazdur, R., 2012. U.S. Food and Drug Administration approval summary: brentuximab vedotin for the treatment of relapsed Hodgkin lymphoma or relapsed systemic anaplastic large-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 5845–5849.
- Defrance, T., Casamayor-Pallejà, M., Krammer, P.H., 2002. The life and death of a B cell. *Adv. Cancer Res.* 86, 195–225.
- De Haard, H.J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S.E., Roovers, R.C., Henderikx, P., de Bruïne, A.P., Arends, J.W., Hoogenboom, H.R., 1999. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J. Biol. Chem.* 274, 18218–18230.
- Dübel, S., Stoevesandt, O., Taussig, M.J., Hust, M., 2010. Generating recombinant antibodies to the complete human proteome. *Trends Biotechnol.* 28, 333–339.
- Durocher, Y., Perret, S., Kamen, A., 2002. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.* 30, E9.
- Droste, P., 2009. Konstruktion und Analyse von neuen scFab-Phagen-Display-Vektoren. Masterarbeit
- Falini, B., Pileri, S., Pizzolo, G., Dürkop, H., Flenghi, L., Stirpe, F., Martelli, M.F., Stein, H., 1995. CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood* 85, 1–14.
- Foote, J., Eisen, H.N., 1995. Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1254–1256.
- Frenzel, A., Hust, M., Schirrmann, T., 2013. Expression of recombinant antibodies. *Front. Immunol.* 4, 217.
- Fröde, D., 2012. Rekombinante Antikörper für die Point-of-care-Diagnostik von CRP.
- Fukuda, I., Kojoh, K., Tabata, N., Doi, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Yanagawa,

- H., 2006. In vitro evolution of single-chain antibodies using mRNA display. *Nucleic Acids Res.* 34, e127.
- Gerber, H.-P., 2010. Emerging immunotherapies targeting CD30 in Hodgkin's lymphoma. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1544-1552.
- Gill, D.S., Wong, Y.W., Margolies, M.N., 1997. Differences in Sequence-Specific Expression of Two Anti-Arsonate Fabs in E.Coli. *Biotechnol. Prog.* 13, 692-694.
- Graff, C.P., Chester, K., Begent, R., Wittrup, K.D., 2004. Directed evolution of an anti-carcinoembryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37 degrees C. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 17, 293-304.
- Green, L.L., Hardy, M.C., Maynard-Currie, C.E., Tsuda, H., Louie, D.M., Mendez, M.J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D.H., Zeng, Y., David, N.E., Sasai, H., Garza, D., Brenner, D.G., Hales, J.F., McGuinness, R.P., Capon, D.J., Klapholz, S., Jakobovits, A., 1994. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat. Genet.* 7, 13-21.
- Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K.P., Gorick, B.D., Hughes-Jones, N.C., 1993. Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J.* 12, 725-734.
- Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H.R., Plückthun, A., 1998. Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14130-14135.
- Hawkins, R.E., Russell, S.J., Winter, G., 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* 226, 889-896.
- Henry, T.J., Pratt, D., 1969. THE PROTEINS OF BACTERIOPHAGE M13. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 62, 800-807.
- Hermeling, S., Crommelin, D.J.A., Schellekens, H., Jiskoot, W., 2004. Structure-Immunogenicity Relationships of Therapeutic Proteins. *Pharm. Res.* 21, 897-903.
- Hoet, R.M., Cohen, E.H., Kent, R.B., Rookey, K., Schoonbroodt, S., Hogan, S., Rem, L., Frans, N., Daukandt, M., Pieters, H., van Hegelsom, R., Neer, N.C., Nastri, H.G., Rondon, I.J., Leeds, J.A., Hufton, S.E., Huang, L., Kashin, I., Devlin, M., Kuang, G., Steukers, M., Viswanathan, M., Nixon, A.E., Sexton, D.J., Hoogenboom, H.R., Ladner, R.C., 2005. Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nat. Biotechnol.* 23, 344-348.
- Holmes, M.A., Buss, T.N., Foote, J., 2001. Structural Effects of Framework Mutations on a Humanized Anti-Lysozyme Antibody. *J. Immunol.* 167, 296-301.
- Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P., Winter, G., 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 19, 4133-4137.
- Horie, R., Watanabe, T., 1998. CD30: expression and function in health and disease. *Semin. Immunol.* 10, 457-470.
- Huang, Z., Li, S., Korngold, R., 1997. Immunoglobulin superfamily proteins: Structure, mechanisms, and drug discovery. *Pept. Sci.* 43, 367-382.
- Huls, G.A., Heijnen, I.A., Cuomo, M.E., Koningsberger, J.C., Wiegman, L., Boel, E., van der Vuurst de Vries, A.R., Loyson, S.A., Helfrich, W., van Berge Henegouwen, G.P., van Meijer, M., de Kruif, J., Logtenberg, T., 1999. A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat. Biotechnol.* 17, 276-281.
- Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A., Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton, D.R., Benkovic, S.J., Lerner, R.A., 1992. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. 1989. *Biotechnol. Read. Mass*

- 24, 517–523.
- Hust, M., Dübel, S., 2005. Phage display vectors for the in vitro generation of human antibody fragments. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 295, 71–96.
- Hust, M., Dübel, S., Schirrmann, T., 2007a. Selection of recombinant antibodies from antibody gene libraries. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 408, 243–255.
- Hust, M., Jostock, T., Menzel, C., Voedisch, B., Mohr, A., Brenneis, M., Kirsch, M.I., Meier, D., Dübel, S., 2007b. Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnol.* 7, 14.
- Hust, M., Maiss, E., Jacobsen, H.-J., Reinard, T., 2002. The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. *J. Virol. Methods* 106, 225–233.
- Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rülker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M.I., Schütte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., Dübel, S., 2011. A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *J. Biotechnol.* 152, 159–170.
- Hust, M., Steinwand, M., Al-Halabi, L., Helmsing, S., Schirrmann, T., Dübel, S., 2009. Improved microtitre plate production of single chain Fv fragments in *Escherichia coli*. *New Biotechnol.* 25, 424–428.
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotný, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E., Crea, R., 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5879–5883.
- Igawa, T., Tsunoda, H., Kuramochi, T., Sampei, Z., Ishii, S., Hattori, K., 2011. Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies. *mAbs* 3, 243–252.
- Irving, R.A., Kortt, A.A., Hudson, P.J., 1996. Affinity maturation of recombinant antibodies using *E. coli* mutator cells. *Immunotechnology Int. J. Immunol. Eng.* 2, 127–143.
- Jefferis, R., 2011. Aggregation, immune complexes and immunogenicity. *mAbs* 3, 503–504.
- Jermutus, L., Honegger, A., Schwesinger, F., Hanes, J., Plückthun, A., 2001. Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 75–80.
- Jia, H., Li, Y., Liu, Y., Yan, Q., Yang, S., Jiang, Z., 2012. Engineering a thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Paecilomyces thermophila* to improve catalytic efficiency at acidic pH. *J. Biotechnol.* 159, 50–55.
- Johnson, S., Griego, S.D., Pfarr, D.S., Doyle, M.L., Woods, R., Carlin, D., Prince, G.A., Koenig, S., Young, J.F., Dillon, S.B., 1999. A direct comparison of the activities of two humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibodies: MEDI-493 and RSHZ19. *J. Infect. Dis.* 180, 35–40.
- Jordan, E., Hust, M., Roth, A., Biedendieck, R., Schirrmann, T., Jahn, D., Dübel, S., 2007. Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium*. *Microb. Cell Factories* 6, 2.
- Kato, T., Sato, K., Suzuki, S., Sasakawa, H., Kurokawa, M., Nishioka, K., Yamamoto, K., 1995. Mammalian expression of single chain variable region fragments dimerized by Fc regions. *Mol. Biol. Rep.* 21, 141–146.
- Kawa, S., Onda, M., Ho, M., Kreitman, R.J., Bera, T.K., Pastan, I., 2011. The improvement of an anti-CD22 immunotoxin: conversion to single-chain and disulfide stabilized form and affinity maturation by alanine scan. *mAbs* 3, 479–486.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A., Virnekäs, B., 2000. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs

- randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.* 296, 57–86.
- Kobayashi, N., Oyama, H., Kato, Y., Goto, J., Söderlind, E., Borrebaeck, C.A.K., 2010. Two-step in vitro antibody affinity maturation enables estradiol-17 β assays with more than 10-fold higher sensitivity. *Anal. Chem.* 82, 1027–1038.
- Kocks, C., Rajewsky, K., 1988. Stepwise intraclonal maturation of antibody affinity through somatic hypermutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8206–8210.
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497.
- Krauss, J., Arndt, M.A.E., Zhu, Z., Newton, D.L., Vu, B.K., Choudhry, V., Darbha, R., Ji, X., Courtenay-Luck, N.S., Deonarain, M.P., Richards, J., Rybak, S.M., 2004. Impact of antibody framework residue VH-71 on the stability of a humanised anti-MUC1 scFv and derived immunoenzyme. *Br. J. Cancer* 90, 1863–1870.
- Kuba, H., Furukawa, A., Okajima, T., Furukawa, K., 2008. Efficient bacterial production of functional antibody fragments using a phagemid vector. *Protein Expr. Purif.* 58, 292–300.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lee, C.C., Perchiacca, J.M., Tessier, P.M., 2013. Toward aggregation-resistant antibodies by design. *Trends Biotechnol.*
- Lee, H.S., Shu, L., De Pascalis, R., Giuliano, M., Zhu, M., Padlan, E.A., Hand, P.H., Schlom, J., Hong, H.J., Kashmiri, S.V., 1999. Generation and characterization of a novel single-gene-encoded single-chain immunoglobulin molecule with antigen binding activity and effector functions. *Mol. Immunol.* 36, 61–71.
- Lewis, L., Lloyd, C., 2012. Optimisation of antibody affinity by ribosome display using error-prone or site-directed mutagenesis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 805, 139–161.
- Li, J., Zhang, C., Jostock, T., Dübel, S., 2007. Analysis of IgG heavy chain to light chain ratio with mutant Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site. *Protein Eng. Des. Sel.* 20, 491–496.
- Lippow, S.M., Wittrup, K.D., Tidor, B., 2007. Computational design of antibody affinity improvement beyond in vivo maturation. *Nat. Biotechnol.* 25, 1171–1176.
- Liu, B., Conrad, F., Roth, A., Drummond, D.C., Simko, J.P., Marks, J.D., 2007. Recombinant full-length human IgG1s targeting hormone-refractory prostate cancer. *J. Mol. Med.* 85, 1113–1123.
- Liu, J.-L., Hu, Z.-Q., Xing, S., Xue, S., Li, H.-P., Zhang, J.-B., Liao, Y.-C., 2012. Attainment of 15-fold higher affinity of a *Fusarium*-specific single-chain antibody by directed molecular evolution coupled to phage display. *Mol. Biotechnol.* 52, 111–122.
- Locher, C.P., Paidhungat, M., Whalen, R.G., Punnonen, J., 2005. DNA shuffling and screening strategies for improving vaccine efficacy. *DNA Cell Biol.* 24, 256–263.
- Lonberg, N., Taylor, L.D., Harding, F.A., Trounstine, M., Higgins, K.M., Schramm, S.R., Kuo, C.C., Mashayekh, R., Wymore, K., McCabe, J.G., 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368, 856–859.
- Low, N.M., Holliger, P.H., Winter, G., 1996. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260, 359–368.
- Marks, J.D., 2004. Antibody affinity maturation by chain shuffling. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 248, 327–343.
- Marks, J.D., Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Clackson, T.P., Bye, J.M., Winter, G., 1992. Bypassing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* 10, 779–783.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G.,

1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222, 581-597.
- Martineau, P., 2002. Error-prone polymerase chain reaction for modification of scFvs. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 178, 287-294.
- Marvin, D.A., 1998. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 150-158.
- Maynard, J.A., Maassen, C.B.M., Leppla, S.H., Brasky, K., Patterson, J.L., Iverson, B.L., Georgiou, G., 2002. Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat. Biotechnol.* 20, 597-601.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J., 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- McHugh, L., Hu, S., Lee, B.K., Santora, K., Kennedy, P.E., Berger, E.A., Pastan, I., Hamer, D.H., 2002. Increased affinity and stability of an anti-HIV-1 envelope immunotoxin by structure-based mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 277, 34383-34390.
- Menzel, C., Schirrmann, T., Konthur, Z., Jostock, T., Dübel, S., 2008. Human antibody RNase fusion protein targeting CD30+ lymphomas. *Blood* 111, 3830-3837.
- Michaelsen, T.E., Natvig, J.B., 1972. Three new fragments, F(ab) 2 , F(c) 2 , and Fab-c, obtained by papain proteolysis of normal human IgG. *Scand. J. Immunol.* 1, 255-268.
- Moutel, S., El Marjou, A., Vielemeyer, O., Nizak, C., Benaroch, P., Dübel, S., Perez, F., 2009. A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. *BMC Biotechnol.* 9, 14.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263-273.
- Nakanishi, T., Maru, T., Tahara, K., Sanada, H., Umetsu, M., Asano, R., Kumagai, I., 2013. Development of an affinity-matured humanized anti-epidermal growth factor receptor antibody for cancer immunotherapy. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 26, 113-122.
- Nowakowski, A., Wang, C., Powers, D.B., Amersdorfer, P., Smith, T.J., Montgomery, V.A., Sheridan, R., Blake, R., Smith, L.A., Marks, J.D., 2002. Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11346-11350.
- Overman, S.A., Thomas, G.J., Jr, 1995. Raman spectroscopy of the filamentous virus Ff (fd, fl, M13): structural interpretation for coat protein aromatics. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 5440-5451.
- Parmley, S.F., Smith, G.P., 1988. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73, 305-318.
- Pavoni, E., Flego, M., Dupuis, M.L., Barca, S., Petronzelli, F., Anastasi, A.M., D'Alessio, V., Pelliccia, A., Vaccaro, P., Monteriù, G., Ascione, A., De Santis, R., Felici, F., Cianfriglia, M., Minenkova, O., 2006. Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer* 6, 41.
- Peeters, M., Price, T., Van Laethem, J.-L., 2009. Anti-epidermal growth factor receptor monotherapy in the treatment of metastatic colorectal cancer: where are we today? *The oncologist* 14, 29-39.
- Pelat, T., Hust, M., Hale, M., Lefranc, M.-P., Dübel, S., Thullier, P., 2009. Isolation of a human-like antibody fragment (scFv) that neutralizes ricin biological activity. *BMC Biotechnol.* 9, 60.
- Pelat, T., Hust, M., Laffly, E., Condemine, F., Bottex, C., Vidal, D., Lefranc, M.-P., Dübel, S., Thullier, P., 2007a. High-affinity, human antibody-like antibody fragment (single-chain variable fragment) neutralizing the lethal factor (LF) of *Bacillus*

- anthracis by inhibiting protective antigen-LF complex formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2758–2764.
- Pelat, T., Hust, M., Laffly, E., Condemine, F., Bottex, C., Vidal, D., Lefranc, M.-P., Dübel, S., Thullier, P., 2007b. High-affinity, human antibody-like antibody fragment (single-chain variable fragment) neutralizing the lethal factor (LF) of *Bacillus anthracis* by inhibiting protective antigen-LF complex formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2758–2764.
- Perchiacca, J.M., Tessier, P.M., 2012. Engineering aggregation-resistant antibodies. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 3, 263–286.
- Phumyen, A., Jumnainsong, A., Leelayuwat, C., 2012. Improved binding activity of antibodies against major histocompatibility complex class I chain-related gene A by phage display technology for cancer-targeted therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 597647.
- Pohl, S.C., Schwarz, S., Frenzel, A., Schirrmann, T., 2012. A Cassette Vector System for the Rapid Cloning and Production of Bispecific Tetravalent Antibodies. *Antibodies* 1, 19–38.
- Pommié, C., Levadoux, S., Sabatier, R., Lefranc, G., Lefranc, M.-P., 2004. IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties. *J. Mol. Recognit. JMR* 17, 17–32.
- Powers, D.B., Amersdorfer, P., Poul, M., Nielsen, U.B., Shalaby, M.R., Adams, G.P., Weiner, L.M., Marks, J.D., 2001. Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. *J. Immunol. Methods* 251, 123–135.
- Prassler, J., Thiel, S., Pracht, C., Polzer, A., Peters, S., Bauer, M., Nörenberg, S., Stark, Y., Kölln, J., Popp, A., Urlinger, S., Enzelberger, M., 2011. HuCAL PLATINUM, a synthetic Fab library optimized for sequence diversity and superior performance in mammalian expression systems. *J. Mol. Biol.* 413, 261–278.
- Putnam, W.S., Li, J., Haggstrom, J., Ng, C., Kadkhodayan-Fischer, S., Cheu, M., Deniz, Y., Lowman, H., Fielder, P., Visich, J., Joshi, A., Jumbe, N.S., 2008. Use of quantitative pharmacology in the development of HAE1, a high-affinity anti-IgE monoclonal antibody. *AAPS J.* 10, 425–430.
- Rajpal, A., Beyaz, N., Haber, L., Cappuccilli, G., Yee, H., Bhatt, R.R., Takeuchi, T., Lerner, R.A., Crea, R., 2005. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8466–8471.
- Rani, M., Bolles, M., Donaldson, E.F., Van Blarcom, T., Baric, R., Iverson, B., Georgiou, G., 2012. Increased antibody affinity confers broad in vitro protection against escape mutants of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 86, 9113–9121.
- Rapoza, M.P., Webster, R.E., 1995. The products of gene I and the overlapping in-frame gene XI are required for filamentous phage assembly. *J. Mol. Biol.* 248, 627–638.
- Ray, D.S., Bscheider, H.P., Hofschneider, P.H., 1966. Replication of the single-stranded DNA of the male-specific bacteriophage M13. Isolation of intracellular forms of phage-specific DNA. *J. Mol. Biol.* 21, 473–483.
- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F., Dübel, S., 2001. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat. Biotechnol.* 19, 75–78.
- Rothe, C., Urlinger, S., Löhning, C., Prassler, J., Stark, Y., Jäger, U., Hubner, B., Bardroff, M., Pradel, I., Boss, M., Bittlingmaier, R., Bataa, T., Frisch, C., Brocks, B., Honegger, A., Urban, M., 2008. The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies. *J. Mol. Biol.* 376, 1182–1200.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol., 0003

- ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schier, R., Bye, J., Apell, G., McCall, A., Adams, G.P., Malmqvist, M., Weiner, L.M., Marks, J.D., 1996. Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J. Mol. Biol.* 255, 28-43.
- Schirrmann, T., Büssow, K., 2010. Transient Production of scFv-Fc Fusion Proteins in Mammalian Cells, in: Kontermann, R., Dübel, S. (Eds.), *Antibody Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 387-398.
- Schirrmann, T., Menzel, C., Hust, M., Prilop, J., Jostock, T., Dübel, S., 2010. Oligomeric forms of single chain immunoglobulin (scIgG). *mAbs* 2, 73-76.
- Schirrmann, T., Steinwand, M., Wezler, X., Ten Haaf, A., Tur, M.K., Barth, S., 2013. CD30 as a Therapeutic Target for Lymphoma. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.*
- Schmiedl, A., Breitling, F., Winter, C.H., Queitsch, I., Dübel, S., 2000. Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in *E. coli*. *J. Immunol. Methods* 242, 101-114.
- Schofield, D.J., Pope, A.R., Clementel, V., Buckell, J., Chapple, S.D., Clarke, K.F., Conquer, J.S., Crofts, A.M., Crowther, S.R.E., Dyson, M.R., Flack, G., Griffin, G.J., Hooks, Y., Howat, W.J., Kolb-Kokocinski, A., Kunze, S., Martin, C.D., Maslen, G.L., Mitchell, J.N., O'Sullivan, M., Perera, R.L., Roake, W., Shadbolt, S.P., Vincent, K.J., Warford, A., Wilson, W.E., Xie, J., Young, J.L., McCafferty, J., 2007. Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. *Genome Biol.* 8, R254.
- Schütte, M., Thullier, P., Pelat, T., Wezler, X., Rosenstock, P., Hinz, D., Kirsch, M.I., Hasenberg, M., Frank, R., Schirrmann, T., Gunzer, M., Hust, M., Dübel, S., 2009. Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 4, e6625.
- Sharkey, R.M., Goldenberg, D.M., 2006. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA. Cancer J. Clin.* 56, 226-243.
- Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A., Presta, L.G., 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.* 276, 6591-6604.
- Siegel, R.W., 2009. Antibody affinity optimization using yeast cell surface display. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 504, 351-383.
- Singh, S.K., 2011. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *J. Pharm. Sci.* 100, 354-387.
- Smith, C.A., Gruss, H.J., Davis, T., Anderson, D., Farrah, T., Baker, E., Sutherland, G.R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 1993. CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* 73, 1349-1360.
- Smith, G.P., 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Stemmer, W.P., 1994a. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370, 389-391.
- Stemmer, W.P., 1994b. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10747-10751.
- Sun, S.B., Sen, S., Kim, N.-J., Magliery, T.J., Schultz, P.G., Wang, F., 2013. Mutational analysis of 48G7 reveals that somatic hypermutation affects both antibody stability and binding affinity. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 9980-9983.

- Tang, Y., Lou, J., Alpaugh, R.K., Robinson, M.K., Marks, J.D., Weiner, L.M., 2007. Regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IgG intrinsic and apparent affinity for target antigen. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 2815–2823.
- Taylor, L.D., Carmack, C.E., Schramm, S.R., Mashayekh, R., Higgins, K.M., Kuo, C.C., Woodhouse, C., Kay, R.M., Lonberg, N., 1992. A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins. *Nucleic Acids Res.* 20, 6287–6295.
- Taylor, P.C., Quattrocchi, E., Mallett, S., Kurrasch, R., Petersen, J., Chang, D.J., 2011. Ofatumumab, a fully human anti-CD20 monoclonal antibody, in biological-naïve, rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 2119–2125.
- Thie, H., 2008. Antikörpervarianten mit verbesserter Affinität [Elektronische Ressource] / von Holger Thie (Online-Ressource).
- Thie, H., Schirrmann, T., Paschke, M., Dübel, S., Hust, M., 2008a. SRP and Sec pathway leader peptides for antibody phage display and antibody fragment production in *E. coli*. *New Biotechnol.* 25, 49–54.
- Thie, H., Schirrmann, T., Paschke, M., Dübel, S., Hust, M., 2008b. SRP and Sec pathway leader peptides for antibody phage display and antibody fragment production in *E. coli*. *New Biotechnol.* 25, 49–54.
- Thie, H., Toleikis, L., Li, J., von Wasielewski, R., Bastert, G., Schirrmann, T., Esteves, I.T., Behrens, C.K., Fournes, B., Fournier, N., de Romeuf, C., Hust, M., Dübel, S., 2011. Rise and fall of an anti-MUC1 specific antibody. *PloS One* 6, e15921.
- Thie, H., Voedisch, B., Dübel, S., Hust, M., Schirrmann, T., 2009. Affinity Maturation by Phage Display, in: Dimitrov, A.S. (Ed.), *Therapeutic Antibodies, Methods in Molecular Biology™*. Humana Press, pp. 309–322.
- Tiller, T., Schuster, I., Deppe, D., Siegers, K., Strohn, R., Herrmann, T., Berenguer, M., Poujol, D., Stehle, J., Stark, Y., Heßling, M., Daubert, D., Felderer, K., Kaden, S., Kölln, J., Enzelberger, M., Urlinger, S., 2013. A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. *mAbs* 5.
- Toleikis, L., 2004. Rekombinante Antikörper gegen tumorassoziiertes MUC1 [Elektronische Ressource] / vorgelegt von Lars Toleikis (Online-Ressource).
- Van Wezenbeek, P.M.G.F., Hulsebos, T.J.M., Schoenmakers, J.G.G., 1980. Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd. *Gene* 11, 129–148.
- Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J., Johnson, K.S., 1996. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotechnol.* 14, 309–314.
- Venturi, M., Seifert, C., Hunte, C., 2002. High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 315, 1–8.
- Vieira, J., Messing, J., 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153, 3–11.
- Visco, C., Nadali, G., Vassilakopoulos, T.P., Bonfante, V., Viviani, S., Gianni, A.M., Federico, M., Luminari, S., Peethambaram, P., Witzig, T.E., Pangalis, G., Cabanillas, F., Medeiros, L.J., Sarris, A.H., Pizzolo, G., 2006. Very high levels of soluble CD30 recognize the patients with classical Hodgkin's lymphoma retaining a very poor prognosis. *Eur. J. Haematol.* 77, 387–394.
- Wang, J., Zhang, Q., Huang, Z., Liu, Z., 2013. Directed evolution of a family 26 glycoside hydrolase: Endo- β -1, 4-mannanase from *Pantoea agglomerans* A021.

- J. Biotechnol.
- Wang, Z., Kim, G.-B., Woo, J.-H., Liu, Y.Y., Mathias, A., Stavrou, S., Neville, D.M., Jr, 2007. Improvement of a recombinant anti-monkey anti-CD3 diphtheria toxin based immunotoxin by yeast display affinity maturation of the scFv. *Bioconjug. Chem.* 18, 947–955.
- Watanabe, M., Ogawa, Y., Itoh, K., Koiwa, T., Kadin, M.E., Watanabe, T., Okayasu, I., Higashihara, M., Horie, R., 2008. Hypomethylation of CD30 CpG islands with aberrant JunB expression drives CD30 induction in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 88, 48–57.
- Weiner, L.M., Surana, R., Wang, S., 2010. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 317–327.
- Wei, Z., Feng, J., Lin, H.-Y., Mullapudi, S., Bishop, E., Tous, G.I., Casas-Finet, J., Hakki, F., Strouse, R., Schenerman, M.A., 2007. Identification of a single tryptophan residue as critical for binding activity in a humanized monoclonal antibody against respiratory syncytial virus. *Anal. Chem.* 79, 2797–2805.
- Werkman, J.R., Pattanaik, S., Yuan, L., 2011. Directed evolution through DNA shuffling for the improvement and understanding of genes and promoters. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 754, 325–342.
- Wezler, X., Hust, M., Helmsing, S., Schirrmann, T., Dübel, S., 2012. Human antibodies targeting CD30(+) lymphomas. *Hum. Antibodies* 21, 13–28.
- Whalen, R.G., Kaiwar, R., Soong, N.W., Punnonen, J., 2001. DNA shuffling and vaccines. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3, 31–36.
- Wu, H., Pfarr, D.S., Johnson, S., Brewah, Y.A., Woods, R.M., Patel, N.K., White, W.I., Young, J.F., Kiener, P.A., 2007. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *J. Mol. Biol.* 368, 652–665.
- Wu, T.T., Kabat, E.A., 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.* 132, 211–250.
- Xie, M.H., Yuan, J., Adams, C., Gurney, A., 1997. Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv. *Nat. Biotechnol.* 15, 768–771.
- Yang, W.P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A.T., Burton, D.R., Barbas, C.F., 3rd, 1995. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* 254, 392–403.
- Yoshinaga, K., Matsumoto, M., Torikai, M., Sugyo, K., Kuroki, S., Nogami, K., Matsumoto, R., Hashiguchi, S., Ito, Y., Nakashima, T., Sugimura, K., 2008. Ig L-chain shuffling for affinity maturation of phage library-derived human anti-human MCP-1 antibody blocking its chemotactic activity. *J. Biochem. (Tokyo)* 143, 593–601.
- Zanotti, R., Trolese, A., Ambrosetti, A., Nadali, G., Visco, C., Ricetti, M.M., Benedetti, F., Pizzolo, G., 2002. Serum levels of soluble CD30 improve International Prognostic Score in predicting the outcome of advanced Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 13, 1908–1914.
- Zhao, X.-L., Chen, W.-Q., Yang, Z.-H., Li, J.-M., Zhang, S.-J., Tian, L.-F., 2009. Selection and affinity maturation of human antibodies against rabies virus from a scFv gene library using ribosome display. *J. Biotechnol.* 144, 253–258.
- Zhou, L., Ni, Y.-Y., Piñeyro, P., Cossaboom, C.M., Subramaniam, S., Sanford, B.J., Dryman, B.A., Huang, Y.-W., Meng, X.-J., 2013. Broadening the Heterologous Cross-Neutralizing Antibody Inducing Ability of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Breeding the GP4 or M genes. *PLoS One* 8, e66645.

Zhu, Z., Yan, L., 2011. Next generation of antibody therapy for cancer. Chin. J. Cancer 30, 293-302.

A ANHANG

Tabelle A.1: Proteinkonzentration gereinigter anti-MUC1 Antikörper

Antikörper	Format	Ausbeute [mg/L]
IIB6	IgG	2
HT186-B7	IgG	60
HT186-D11	IgG	17
HT186-G2	IgG	9
IIB6	scFv-Fc	172
HT186-B7	scFv-Fc	195
HT186-D11	scFv-Fc	227
HT186-G2	scFv-Fc	157
HT186-D11	sclgG	106

Tabelle A.2: Proteinkonzentration gereinigter anti-CD30 Antikörper, 10 mL Produktionsmaßstab

Antikörper	Format	Ausbeute [mg/L]
SH313-F9	IgG	2,7
MiS200-B3	IgG	7,0
MiS200-G12	IgG	6,1
MiS200-D12	IgG	16,0
MiS201-C3	IgG	10,3
MiS201-F2	IgG	4,0
MiS179-F5	IgG	8,7
MiS201-F6	IgG	0,2
MiS203-C1	IgG	0,1
MiS203-C9	IgG	0,1
MiS196-D5	IgG	0,4
SH313-F9	scFv-Fc	31,1
MiS200-B3	scFv-Fc	20,4
MiS200-G12	scFv-Fc	19,3
MiS200-D12	scFv-Fc	27,4
SH313-F9	sclgG	9,8
MiS201-C3	sclgG	5,3
MiS201-F2	sclgG	24,9
MiS179-F5	sclgG	10,3
MiS201-F6	sclgG	14,7

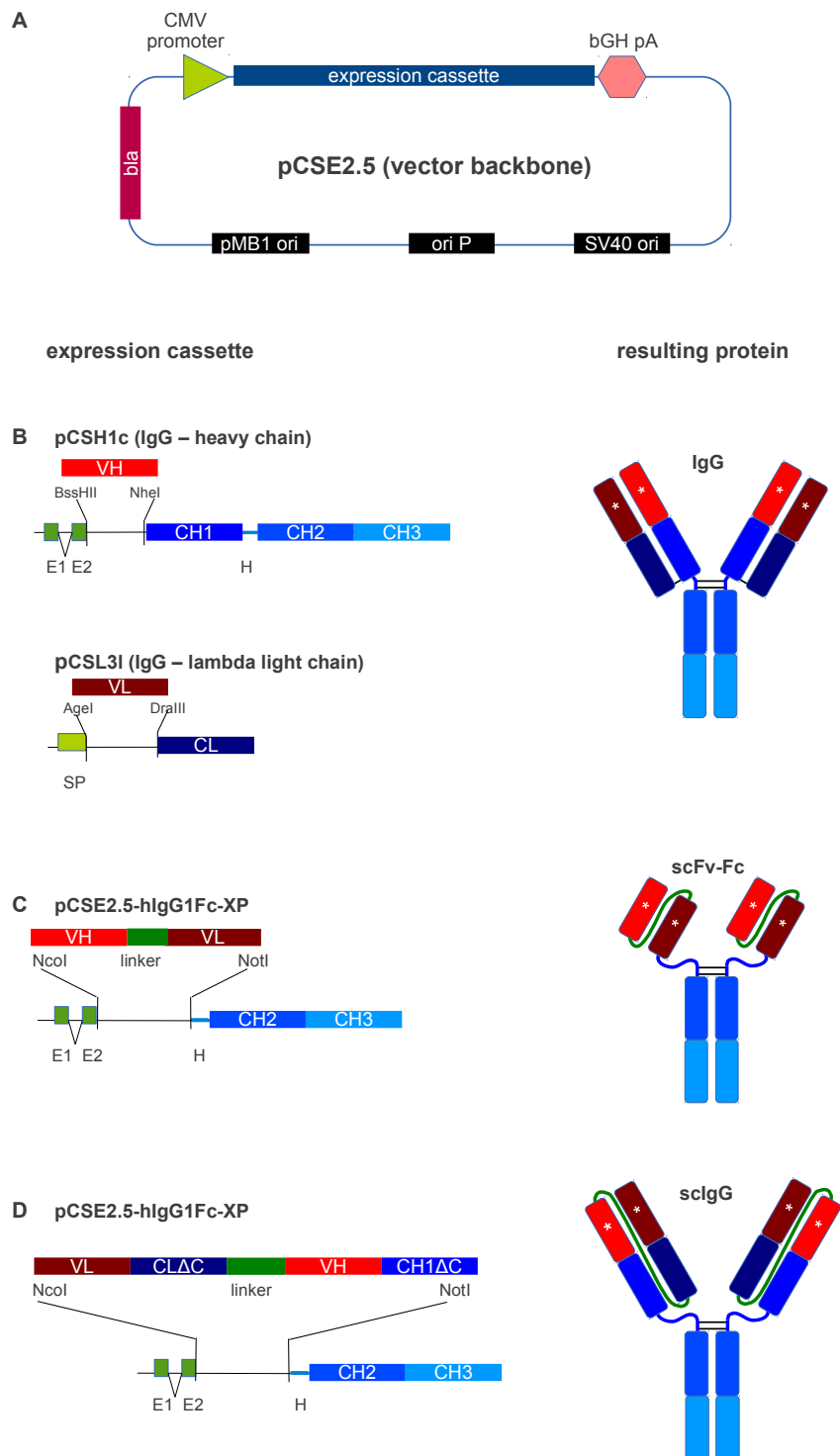


Abbildung A.1: Verwendete eukaryotische Vektoren und Antikörperformate

Basisvektor für die eukaryotische Produktion (A) mit Expressionskassetten für IgG (B), scFv-Fcs (C) und sclgGs (D). bGH pA, Poly A Signal des bovinen Wachstumshormons; bla, β -Lactamase-Gen (Selektionsmarker); CH1-3 und CL, konstante Antikörperdomänen von schwerer und leichter IgG1-Kette; CMV, unmittelbarer, früher Promotor des Cytomegalovirus; E1 und E2, Exon 1 und 2; H, IgG1-Gelenkregion; ori P, Replikationsursprung des Epstein-Barr Virus (EBV); SP, Signalpeptid; SV40 ori, Replikationsursprung des Simian-Virus-40; VH, Gen der variablen Domäne der schweren Kette; VL, Gen der variablen Domäne der leichten Kette; pMB1 ori, Replikationsursprung für *E. coli*.

Tabelle A.3: Proteinkonzentration gereinigter anti-CD30 Antikörper mit ausgetauschter IgG-Kette

V_H	V_L	Ausbeute [mg/L]
SH313-F9	SH313-F9	2,2
MiS200-B3	SH313-F9	1,8
MiS200-G12	SH313-F9	0,3
MiS200-D12	SH313-F9	1,4
MiS201-C3	SH313-F9	1,6
MiS201-F2	SH313-F9	0,8
MiS179-F5	SH313-F9	3,2
MiS201-F6	SH313-F9	0,6
MiS203-C1	SH313-F9	0,3
MiS203-C9	SH313-F9	0,3
MiS196-D5	SH313-F9	3,0
SH313-F9	MiS200-B3	1,1
SH313-F9	MiS200-G12	0,2
SH313-F9	MiS200-D12	1,4
SH313-F9	MiS201-C3	0,1
SH313-F9	MiS201-F2	<0,1
SH313-F9	MiS179-F5	0,6
SH313-F9	MiS201-F6	0,1
SH313-F9	MiS203-C1	0,9
SH313-F9	MiS203-C9	0,4
SH313-F9	MiS196-D5	0,3

Tabelle A.4: Auswahl von Antikörpern für die Neukombination von Mutationen

scFv	scFabΔC	FabΔC
MiS200-B3	MiS142-C4	MiS203-C1
MiS200-B6	MiS179-F5	MiS203-C9
MiS200-C1	MiS179-F11	MiS196-D5
MiS200-D12	MiS201-B1	MiS209-E8
MiS200-G12	MiS201-B5	MiS209-E9
	MiS201-C3	MiS209-F5
	MiS201-C8	
	MiS201-D1	
	MiS201-F2	
	MiS201-F6	
	MiS201-G3	
	MiS201-G12	
	MiS201-H1	

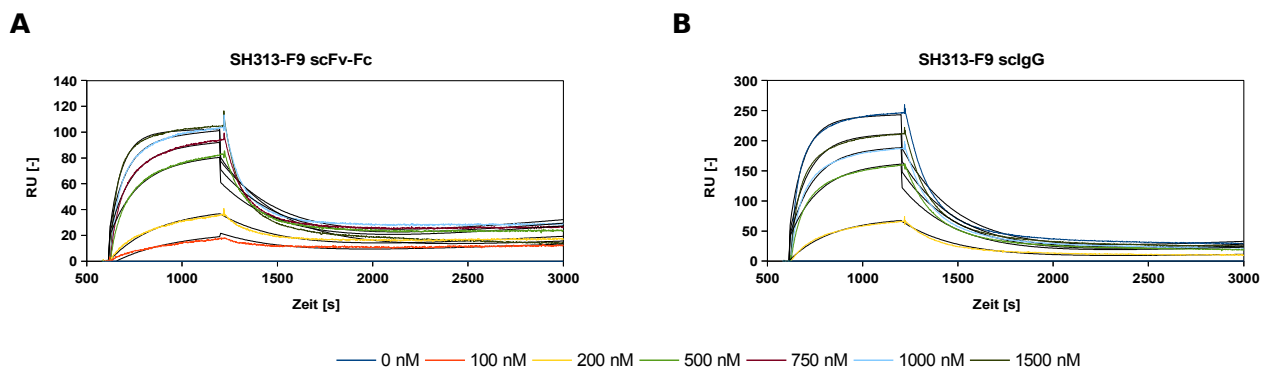


Abbildung A.2: Analyse von Bindungskinetiken des SH313-F9 scFv-Fcs und scIgGs
Dargestellt sind die Sensogramme der kinetischen Messung des CD30-spezifischen Antikörpers SH313-F9 scFv (A) und scIgGs (B). Die Messungen erfolgten auf einen CM5-Chip auf dem ein monoklonaler Maus anti-human IgG (Fc-spezifisch) gekoppelt war. Anhand der in schwarz dargestellten theoretischen Kurvenverläufen des mathematischen Modells nach Langmuir mit driftender Basislinie wurde die Dissoziationskonstante K_D berechnet.

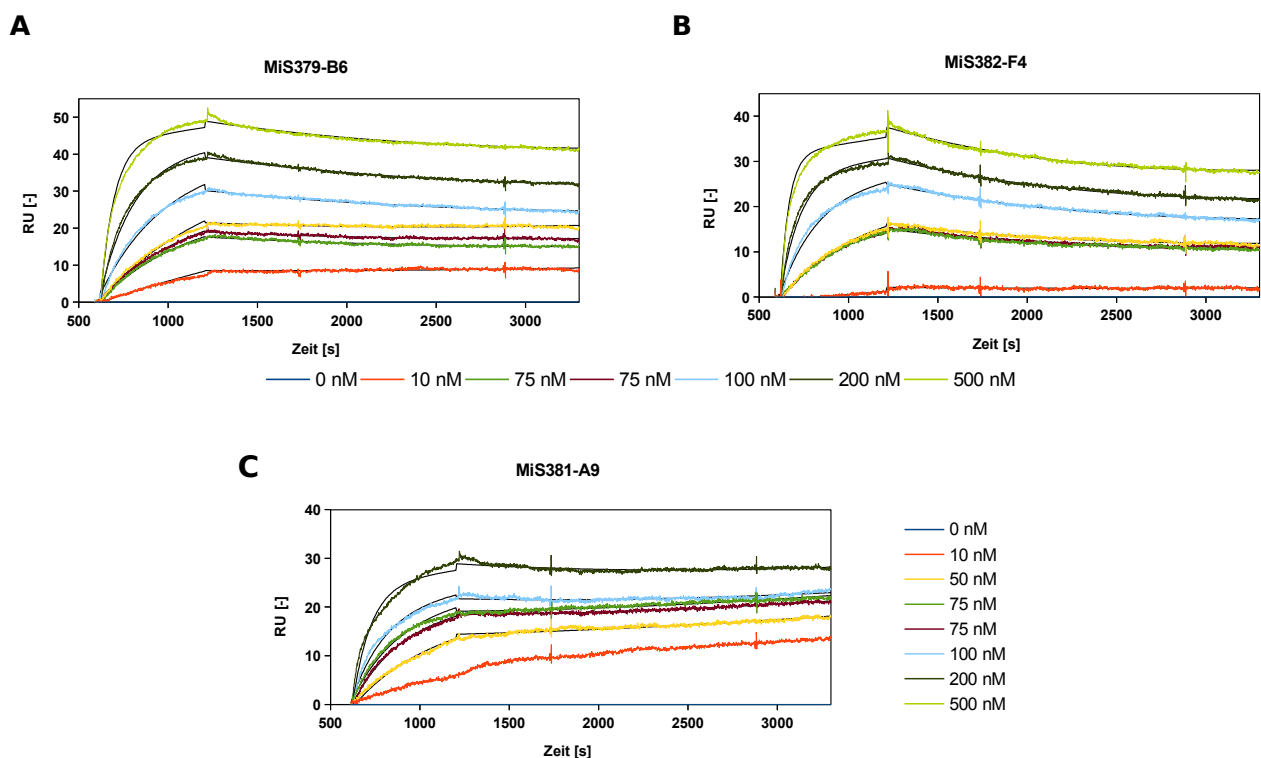


Abbildung A.3: Analyse von Bindungskinetiken von IgGs
Dargestellt sind die Sensogramme der kinetischen Messung des CD30-spezifischen IgGs MiS379-B6 (A), MiS382-F4 (B) und MiS381-A9 (C). Die Messungen erfolgten auf einen CM5-Chip auf dem ein monoklonaler Maus anti-human IgG (Fc-spezifisch) gekoppelt war. Anhand der in schwarz dargestellten theoretischen Kurvenverläufen des mathematischen Modells nach Langmuir mit driftender Basislinie und lokal berechneter R_{max} wurde die Dissoziationskonstante K_D berechnet.

DANKSAGUNG

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen auf verschiedenste Weise beigetragen. Ihnen möchte ich an dieser Stelle danken.

Zu Beginn danke ich Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, seine wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung sowie die Übernahme des Hauptreferats.

Bei Prof. Dr. Jürgen Bode möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Prof. Dr. Michael Steinert danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Thomas Schirrmann und PD Dr. Michael Hust danke ich für die Unterstützung und die vielen Anregungen. Besonders danke ich Dr. André Frenzel für die Diskussionsbereitschaft und die Korrektur dieser Arbeit. Saskia Helmsing möchte ich für die Bereitstellung der scFvs SH313-B5 und -F9 sowie für den Erfahrungsaustausch danken. Ihnen und allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und den freundlichen Umgang miteinander.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinen Eltern, für die liebevolle Unterstützung und den Rückhalt.

Patrick, danke für deine Unterstützung und deine Ratschläge. Danke, dass Du immer für mich da bist.